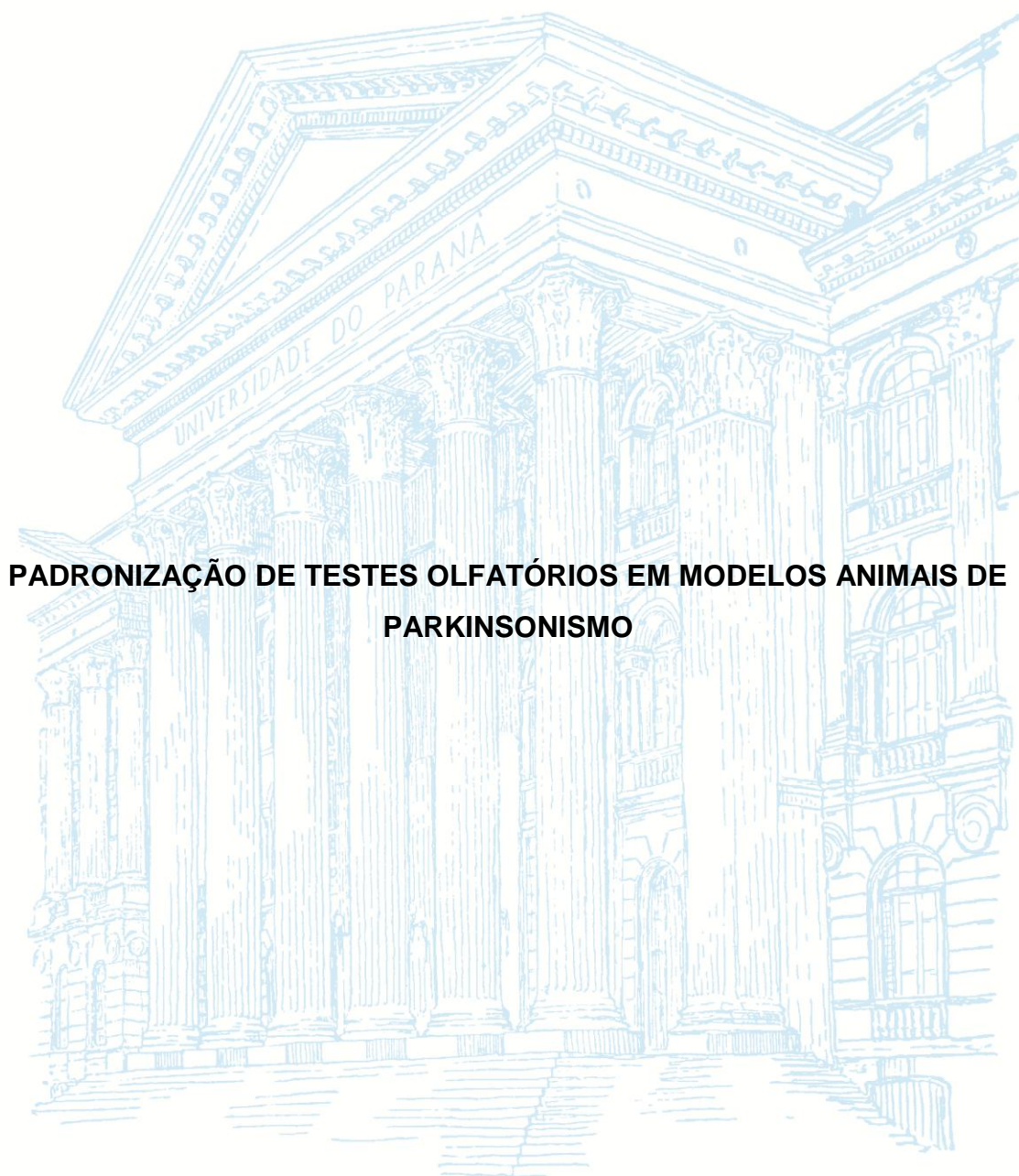


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PRISCILLA LUIZA SILVEIRA DE SOUZA



**PADRONIZAÇÃO DE TESTES OLFATÓRIOS EM MODELOS ANIMAIS DE
PARKINSONISMO**

CURITIBA

2017

PRISCILLA LUIZA SILVEIRA DE SOUZA

**PADRONIZAÇÃO DE TESTES OLFATÓRIOS EM MODELOS ANIMAIS DE
PARKINSONISMO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Meira Santos Lima

Co-orientadora: Doutoranda Lais Soares Rodrigues

CURITIBA

2017

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas da minha família que sempre acreditaram em mim e investiram tempo me ouvindo, orando, zelando por mim e se preocupando comigo todos os dias desses quatro longos (ou não) anos. Vocês sempre participaram de uma forma ou outra dessa caminhada e, no fim das contas, essa vitória é nossa. Seja à distância, seja ao vivo, mas principalmente neste último ano de muita tensão, dúvidas, incerteza, choros, risos e novos desafios, vocês sempre estiverem aí por mim, e isto é insubstituível. Muito obrigada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo de Meira Santos Lima, por me conceder a oportunidade de ingressar no Laboratório de Neurofisiologia em 2015 e por me proporcionar a partir de então uma das melhores e mais relevantes experiências minhas dentro do curso. Obrigada por ter acreditado no meu potencial desde o início, me oferecendo toda ajuda e apoio necessário nesta caminhada, e também pelo aprendizado compartilhado ao longo desses anos que serão certamente levados para o resto da minha vida.

À doutoranda Lais Soares Rodrigues, co-orientadora deste projeto, por toda dedicação e auxílio conferidos a mim e ao trabalho e pela preocupação, carinho e presença em cada etapa desse trajeto. Obrigada pelas palavras de conforto quando precisei e pela paciência despendida para me ensinar tantas coisas. Não poderia ter tido melhor experiência com uma parceira de laboratório e cientista como você.

A todos os demais integrantes do laboratório: Adriano, Ana, Flávia, Jéssica, Juliane, Patrícia e às ICs Amanda e Suzen, que participaram de alguma forma deste trabalho, seja pela atenção, pelos conselhos, pelas sugestões ou pela ajuda nos testes ou nas cirurgias. Desejo-lhes todo sucesso do mundo e agradeço pela parceria durante este tempo que eu estive no laboratório e por todas as risadas e ensinamentos que tive com vocês.

À Glaucia Tobaldini, e, em especial, ao seu gato Biju, por ter tornado este projeto possível através da doação da sua coleira para podermos realizar os testes.

A todos os amigos que já vieram comigo de longa data e a todos os colegas de curso de Biomedicina. Um agradecimento especial a cada um dos novos amigos que cultivei nestes quatros anos, que me acolheram como ninguém nesta cidade grande e inspiradora. Vocês foram os melhores presentes que eu poderia ter

recebido de Curitiba e só tenho a agradecer pelo suporte que tive para sobreviver às barras do curso e pelas mil e uma histórias e lembranças felizes que guardo com cada um de vocês. Podem ter certeza que vamos estar juntos independentemente dos diversos caminhos que cada um seguir. Vocês são para a vida.

E, por fim, à CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro concedido a este projeto.

RESUMO

O sistema olfatório de mamíferos é um dos principais meios de comunicação destes com o ambiente, possibilitando a procura por alimento, a interação social e a detecção de predadores. A informação sensorial gerada pelas moléculas de odor é levada ao bulbo olfatório (BO) através das células receptoras de odor e é então transmitida para as células mitrais/tufosas, as quais projetam a informação olfatória em direção ao córtex encefálico. O perfil de ativação dos glomérulos presentes no BO é dependente das propriedades físico-químicas de cada odor, como, por exemplo, de um odor apetitivo e de um odor de um predador, capazes de gerar respostas comportamentais bastante distintas entre si. Uma das doenças neurodegenerativas que pode afetar este sistema e desencadear um déficit na discriminação de odores é a doença de Parkinson (DP), composta não apenas por sintomas motores clássicos, mas também por sintomas não motores, como a hiposmia, que afetam a qualidade de vida dos pacientes. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a função olfatória de modelos animais de Parkinsonismo (rotenona e 6-OHDA) e realizar uma análise comparativa de diferentes testes olfatórios a fim de discutir o teste mais adequado para avaliar as respostas comportamentais nos modelos utilizados. Para isso, ratos Wistar foram submetidos à lesão intranigral por rotenona ou 6-OHDA ou à lesão intranasal por Zicam® (controle positivo para o prejuízo olfatório) e, após, foram submetidos ao teste de discriminação social, de preferência olfatória e de aversão ao odor, utilizando, respectivamente, odor familiar, odor apetitivo e odor de predador (aversivo). O tempo de permanência dos animais em cada um dos compartimentos foi quantificado, sendo avaliado também o tempo de *freezing* dos animais no teste de aversão. Com isto, observou-se que todos os grupos tiveram uma preferência por um compartimento específico em uma das habituações realizadas antes dos testes ou em ambas. Verificou-se também, por meio do tempo de *freezing*, a eficácia do odor de predador em desencadear respostas inatas de aversão e medo nos animais naive e sham, além de revelar um prejuízo olfatório no grupo Rotenona e 6-OHDA, que tiveram uma redução significativa no tempo de *freezing* em comparação com o grupo Naive ($P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$) e com o grupo Sham ($P \leq 0,05$). Conclui-se que muitos fatores ambientais parecem estar envolvidos no comportamento dos animais perante os testes, sendo o odor de predador responsável por gerar os resultados mais expressivos e podendo assim representar uma ferramenta útil para analisar os déficits na função olfatória presentes nos modelos animais de Parkinsonismo.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. Odor aversivo. Preferência olfatória. Prejuízo olfatório.

ABSTRACT

The mammalian's olfactory system is one of their major ways of communication with the environment, making it possible the searching for food, the social interaction and the detection of predators. The sensorial information generated by odors molecules is conducted to the olfactory bulb (OB) through the odors receptors cells and then transmitted to the mitral/tufted cells, which project the information toward the encephalic cortex. The activation pattern of the glomeruli present in BO depends on the physic-chemical properties of each odor, such as appetitive odor and predator's odor, which are capable of generating behavioral responses well distinct between them. Parkinson's disease (PD) is one of the neurodegenerative diseases that can affect this system and trigger an olfactory dysfunction along with a deficit in odors discrimination. PD is composed not only by classic motor symptoms but also by non-motor symptoms such as hyposmia, which affect their patient's quality of life. In that view, the purpose of this study consisted in evaluating the olfactory function of animal models of Parkinsonism (rotenone or 6-OHDA) and making a comparative analysis of the different types of olfactory tests in order to discuss the most adequate one for evaluating the behavioral responses of the models. Thus, Wistar rats were submitted to intranigral lesion by rotenone or 6-OHDA or to intranasal lesion provoked by Zicam® (positive control for olfactory dysfunction) and then submitted to a social discrimination task, an olfactory preference task and an odor aversion task, using a familiar odor, an appetitive odor and a predator odor respectively. Lately, time of animals' permanence in each compartment of the tests was quantified, also being evaluated the freezing behavior of each animal in the odor aversion test. It was observed that all of the groups had a preference for one specific compartment in one or in both habituations performed before the tests. Moreover, the efficacy of predator odor in triggering innate responses of aversion and fear in naive and sham animals was verified by freezing time, as well as the manifestation of olfactory dysfunction in Rotenone and 6-OHDA groups, which had a significant reduction on freezing time in comparison with Naive ($P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$) and Sham group ($P \leq 0,05$). In conclusion, many environmental factors seem to be involved on animal's behaviors in these tests. Besides that, predator odor was responsible for generating the most expressive results and may represent a useful tool to analyze the olfactory deficits present in the animal models of Parkinsonism.

Key-words: Aversive odor. Olfactory dysfunction. Olfactory preference. Parkinson's disease.

LISTA DE SIGLAS

6-OHDA	–	6-hidroxidopamina
BO	–	Bulbo olfatório
DA	–	Dopamina
DP	–	Doença de Parkinson
L-DOPA	–	L-dihidroxifenilalanina
MPTP	–	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NA	–	Noradrenalina
OVN	–	Órgão vomeronasal
SNpc	–	Substância negra <i>pars compacta</i>
TDO	–	Teste de discriminação olfatória
TH	–	Tirosina hidroxilase
TMT	–	2,5-diidro-2,4,5-trimetiltiazol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 OBJETIVO GERAL	12
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
1.3 JUSTIFICATIVA	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 SISTEMA OLFATÓRIO E SUA IMPORTÂNCIA EVOLUTIVA	14
3.2 RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS DE MAMÍFEROS FRENTE A UM ODOR APETITIVO	17
3.3 RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS DE MAMÍFEROS FRENTE A UM ODOR DE PREDADOR	18
3.4 DISTÚRPIO OLFATÓRIO NA DOENÇA DE PARKINSON	20
3.5 MODELOS ANIMAIS DE PARKINSONISMO	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 ANIMAIS	25
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	25
4.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	26
4.4 ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE GLUCONATO DE ZINCO+SOLUÇÃO DE ACETATO DE ZINCO (ZICAM®)	27
4.5 TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA	27
4.6 TESTE DE PREFERÊNCIA AO ODOR APETITIVO	28
4.7 TESTE DE AVERSÃO AO ODOR	28
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
5. RESULTADOS	30
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXO 1	50

1. INTRODUÇÃO

Em muitas espécies animais a função olfatória é crítica para a sobrevivência no ambiente, e, por esse motivo, ela é considerada fruto de um ganho evolutivo importante dos mamíferos ao longo do tempo (DOTY, 1986). Apesar da anatomia básica do sistema olfatório ter sido conservada ao longo de 500 milhões de anos relativos à evolução dos vertebrados, em cada espécie há um processamento fino da informação olfatória com o intuito de reconhecer uma série de moléculas de odor específicas e inerentes a sua função evolutiva (HOOVER, 2010). A primeira etapa desse sistema envolve a detecção das moléculas de odor através dos neurônios sensoriais presentes no epitélio olfatório, situado na região posterior da cavidade nasal. Tais neurônios expressam tipos específicos de proteínas receptoras capazes de reconhecer determinados grupos estruturais das moléculas odoríferas, e os seus axônios convergem em direção aos glomérulos presentes no bulbo olfatório (BO), regiões nas quais ocorrem as sinapses entre os neurônios receptores de odor e as células mitrais/tufosas que ali residem (MOMBAERTS, 2004). A informação sensorial é processada de uma forma organizada e complexa. Cada neurônio sensorial expressa apenas um único tipo de receptor odorífero e os diferentes tipos de odores são decodificados por diferentes combinações desses receptores (MALNIC et al., 1999; MOMBAERTS, 2004). Dessa forma, o grupo de neurônios sensoriais ativados por um mesmo odor ativa um ou poucos glomérulos específicos no BO, de onde as células mitrais/tufosas projetam-se em direção a várias regiões encefálicas superiores envolvidas na percepção do odor (FIRESTEIN et al., 2001).

Sabe-se que os odores têm a capacidade de provocar alterações comportamentais significativas em animais e que a resposta que os mamíferos têm frente a um odor é modulada pelo componente emocional que tal odor pode promover, uma vez que a informação olfatória modula a ativação do sistema límbico desses organismos (HOOVER, 2010). Sabe-se também que tais odores são denominados semioquímicos (i.e., substâncias químicas envolvidas na comunicação entre seres vivos) e estão subdivididos em dois grupos principais: os feromônios, que estão relacionados a interações de organismos da mesma espécie e os aleloquímicos, relacionados a interações de organismos de espécies distintas

(NIELSEN et al., 2015). Os feromônios são substâncias químicas detectadas através do órgão vomeronasal (OVN), o qual se conecta com o bulbo olfatório acessório, e agem regulando as interações sociais e os comportamentos reprodutivos dos organismos (BUCK, 2000). Além disso, já foi demonstrado que certos odores provenientes de predadores são capazes de ativar o bulbo olfatório acessório de forma semelhante a feromônios, desencadeando uma reação inata de evasão e medo em suas presas, como em roedores, nos quais tal resposta é caracterizada por tentativas de fuga e inibição do comportamento adaptativo de *grooming* (STAPLES et al., 2008).

Os odores sociais aversivos podem ser encontrados, por exemplo, na pele, na saliva, nas fezes e na urina de seus predadores e são referidos como cairomônios, uma vez que desencadeiam um efeito adaptativo no organismo detector (APFELBACH et al., 2005). Sendo assim, tais semioquímicos são responsáveis por desencadear respostas estereotipadas de aversão e medo por meio do estímulo do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, o qual dispara uma resposta simpática de estresse na presa (FERRERO et al., 2011). Muitos odores de predador têm sido utilizados em estudos comportamentais e analisados a fim de identificar as respostas aversivas do animal e o padrão de ativação de receptores olfatórios promovido por cada odor, tal como o odor de gato, responsável por ativar o OVN e assim desencadear respostas inatas de medo e aversão em roedores, como já foi demonstrado por meio de vários estudos (DIELENBERG e MCGREGOR, 2001; MCGREGOR et al., 2002; STAPLES et al., 2008).

E, além do conjunto de odores aversivos, que pode ser composto também por moléculas nocivas ao animal como o pentanal e o ácido 2-metilbutírico oriundos de alimentos vencidos, há também um conjunto de odores que geram respostas de recompensa no animal. Em se tratando de roedores, os odores apetitivos podem ser provenientes de diversas fontes, sociais ou não, como exemplo, da urina de fêmea ou de alimentos como a manteiga de amendoim, respectivamente. Sabe-se que a manteiga de amendoim é capaz de ativar o sistema olfatório principal e de produzir assim respostas reprodutíveis e hedônicas que permitem ser mensuradas pelo tempo de investigação do objeto odorante pelo animal (KOBAYAKAWA et al., 2007; CHO et al., 2017). Em humanos, os diferentes tipos de odores podem ser modulados pela experiência vivenciada e evocada por determinado odor, assim

como pelo estado social e pelo contexto cultural em que o indivíduo está inserido, sendo necessário o recrutamento de neurônios que se projetam para áreas límbicas, como a amígdala e o hipocampo, nesse processo perceptivo diferencial do odor (BUCK, 2000; ROUBY, POULIOT e BENSAFI, 2009).

Uma vez que os seres humanos, assim como os demais seres vivos, dependem bastante da olfação para detectar informações sensoriais do seu meio, um distúrbio olfatório tem o potencial de causar um impacto negativo no desempenho geral dos indivíduos relacionado às mais variadas tarefas do dia-a-dia, de forma a prejudicar invariavelmente a sua qualidade de vida. Tal prejuízo olfatório pode ter origem em várias etapas do sistema olfatório que vão desde as células receptoras de odor no epitélio olfatório aos neurônios do córtex cerebral que processam a informação odorífica. Uma das doenças neurológicas cujos sintomas relatados frequentemente pelos pacientes na clínica incluem a diminuição da capacidade olfatória é a doença de Parkinson (DP), caracterizada pela neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos presentes na substância negra *pars compacta* (SNpc) e em outras estruturas do encéfalo, tal como o BO (KOVÁCS, 2004). Além disso, a neurodegeneração presente na doença compreende um processo que se inicia muito antes do aparecimento dos distúrbios motores, traduzindo-se em sinais e sintomas pré-clínicos como hiposmia ou anosmia, por exemplo (HAEHNER, HUMMEL e REICHMANN, 2009). Por conta disso, a investigação dos distúrbios olfatórios torna-se imprescindível para buscar entender melhor a etiologia e as características sintomáticas desta doença neurológica.

Dessa forma, faz-se necessário que a ocorrência do prejuízo olfatório seja avaliada por meio de testes específicos conduzidos em modelos animais que mimetizam a doença, testes que têm sido aprimorados para obtenção de dados comportamentais mais fidedignos e condizentes com a real condição dos pacientes que convivem com um prejuízo da função (CHO et al., 2017). No entanto, apesar da diversidade de testes olfatórios que podem ser reproduzidos, não há ainda uma padronização para os testes realizados em modelo animal de Parkinsonismo, o que dificulta a identificação do perfil comportamental dos animais e a análise do prejuízo olfatório que estes animais vêm a apresentar.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a função olfatória, em modelos animais de Parkinsonismo, induzidos por infusão intranigral de rotenona ou 6-OHDA, através de testes de discriminação, preferência e aversão olfatória.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar o desempenho na tarefa olfatória dos modelos animais de Parkinsonismo com o grupo controle positivo para o distúrbio olfatório tratado com gluconato de zinco (Zicam®);
- Avaliar se o comprometimento olfatório produzido pelos modelos estudados estaria relacionado à preferência e/ou à aversão olfatória;
- Identificar o teste mais adequado (preferência ou aversão), comparativamente com o teste de discriminação olfatória, para avaliação do comprometimento olfatório causado pelos modelos animais de Parkinsonismo.

1.3 JUSTIFICATIVA

Para o estudo do sistema olfatório, existe uma gama de testes disponíveis com diferentes protocolos utilizados para analisar parâmetros comportamentais de animais frente a contextos apetitivos ou aversivos a um determinado estímulo odorífero. Sabe-se que a DP é uma doença neurodegenerativa que pode acometer o BO e levar a sintomas não motores como a hiposmia, que afeta cerca de 90% dos seus pacientes e que compromete a qualidade de vida dessas pessoas (DOTY, DEEMS e STELLAR, 1988). Por isso, torna-se imprescindível o estudo da fisiopatologia da DP e, nesse sentido, os testes empregados em modelo animal, como o olfatório, têm contribuído para um melhor entendimento da doença e dos sintomas que a acompanham.

A falta de padronização, todavia, para testes olfatórios realizados com modelos animais de Parkinsonismo, sejam eles relacionados à preferência, aversão ou discriminação olfatória, dificulta uma abordagem precisa e fidedigna sobre a condição olfatória desses animais, assim como a seleção de um protocolo específico para cada tipo de teste cujos dados possam ser extrapolados, em sequência, para seres humanos. Dessa forma, uma análise comparativa destes diferentes testes olfatórios, sejam eles já empregados ou com potencial de serem adotados em estudos futuros, permitirá detectar e distinguir possíveis variações comportamentais, identificando o método mais adequado a ser utilizado para a avaliação do prejuízo olfatório de animais frente a um contexto de Parkinsonismo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SISTEMA OLFATÓRIO E SUA IMPORTÂNCIA EVOLUTIVA

A capacidade olfatória permite a regulação de diversas características fisiológicas, tais como respostas emocionais, funções reprodutivas e comportamentos sociais, além de possibilitar a busca por alimento e a detecção de predadores (LLEDO, GHEUSI e VINCENT, 2005). Nos mamíferos, há também o componente emocional da olfação, que proporciona a associação entre um odor e uma experiência vivenciada por um indivíduo através de conexões cerebrais com o sistema límbico (HOOVER, 2010). A primeira estrutura sensorial do sistema olfatório compreende o OVN, estrutura localizada no septo nasal que transfere informações químicas referentes aos feromônios emitidos por um animal do sexo oposto ou por um animal jovem da mesma espécie através do bulbo olfatório acessório. Este, por sua vez, transmite sinais à amígdala e ao hipotálamo, fornecendo o estado reprodutivo e social desse animal (DOVING e TROTIER, 1998). A segunda estrutura compreende o epitélio olfatório principal, localizado na cavidade nasal, o qual detém neurônios sensoriais ciliados que detectam precisamente moléculas odoríferas e que se projetam em direção ao BO, que, por sua vez, alberga tais neurônios e é composto por glomérulos que são ativados por eles (MOMBAERTS et al., 1996; LLEDO, GHEUSI e VINCENT, 2005) (figura 2).

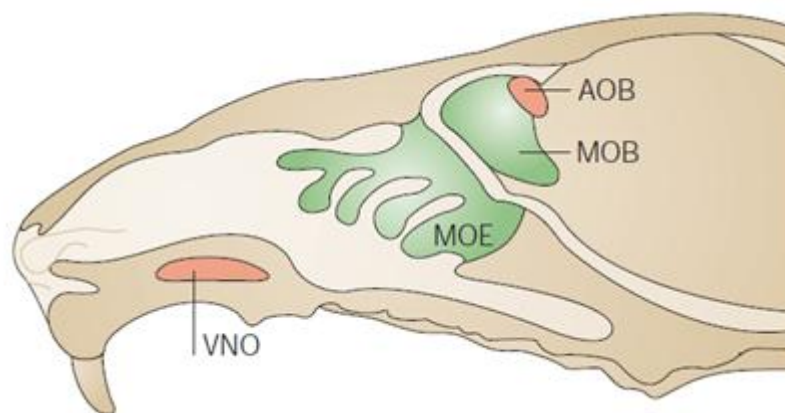


Figura 1. Representação esquemática do sistema olfatório de camundongos com a presença do OVN e do epitélio olfatório principal, os quais projetam neurônios para o bulbo olfatório acessório e principal, respectivamente. Retirado de Mombaerts, 2004.

Em ratos, o BO presente na via principal possui aproximadamente 2000 glomérulos, sendo que estes compreendem o terminal sináptico entre os axônios dos neurônios sensoriais receptores de odor e os dendritos das células mitrais/tufosas, as quais representam os neurônios principais do BO e se encarregam de levar a informação olfatória até o córtex piriforme, ao hipocampo e também à amígdala, onde ela é processada (FIRESTEIN, 2001). Uma única molécula odorífica pode ser reconhecida por diferentes tipos de receptores de odor, presentes nos neurônios sensoriais, que levam a informação até o BO, no entanto, cada receptor reconhece moléculas apenas com características moleculares específicas, uma vez que este consegue detectar variâncias mínimas nas suas estruturas (MALNIC et al., 1999; UCHIDA et al., 2000). Aspectos como tipo e posição dos grupos estruturais, comprimento e ramificação das cadeias de carbono, presença de insaturações e cargas, tamanho e forma da molécula influencia a qualidade final e a percepção pelo organismo frente ao estímulo odorífico (UCHIDA et al., 2000). A transmissão do sinal olfatório parece ser devido principalmente a ativação de uma cascata de AMPc nos neurônios sensoriais cujos receptores foram estimulados (FIRESTEIN, 2001). Além disso, cada um desses receptores é representado um ou poucos glomérulos específicos que recebem projeções dos seus respectivos neurônios sensoriais, sendo tais glomérulos localizados tanto na parte medial quanto na parte lateral do BO, indicando a presença de um mapa topográfico de domínios de diferentes receptores nessa região (MORI, 2003; MOMBAERTS, 2004).

Além da sinapse entre os neurônios sensoriais e as células mitrais/tufosas no BO, as quais recebem glutamato liberado pelos neurônios pré-sinápticos, há a presença de neurônios periglomerulares, os quais liberam GABA e dopamina (DA) para dentro dos glomérulos e levam à redução da transmissão sináptica dos terminais neuronais (LLEDO, GHEUSI e VINCENT, 2005) (figura 2). Sabe-se que os neurônios mais abundantes no BO são as células granulares, que liberam GABA, e que ele é composto de uma população de 10% de neurônios dopaminérgicos na sua camada glomerular, sendo a DA responsável pela modulação da função olfatória através dos seus receptores do tipo D2 (BETARBET et al., 1996; LLEDO, GHEUSI e VINCENT, 2005; RODRIGUES et al., 2014). A despolarização de uma célula receptora de odor leva a sua liberação de glutamato na fenda sináptica, o que induz

então à despolarização das células inibitórias periglomerulares. Tais células compreendem interneurônios que liberam como resposta ao estímulo excitatório GABA e DA para as células mitrais/tufosas e para os neurônios receptores de odor (O'CONNOR e JACOB, 2008). Esta modulação da atividade dos neurônios glomerulares através de uma interação de *feedback* negativo com estes interneurônios inibitórios resulta por fim na modulação da informação olfatória que é transmitida através das células mitrais/tufosas para o córtex olfatório (O'CONNOR e JACOB, 2008).

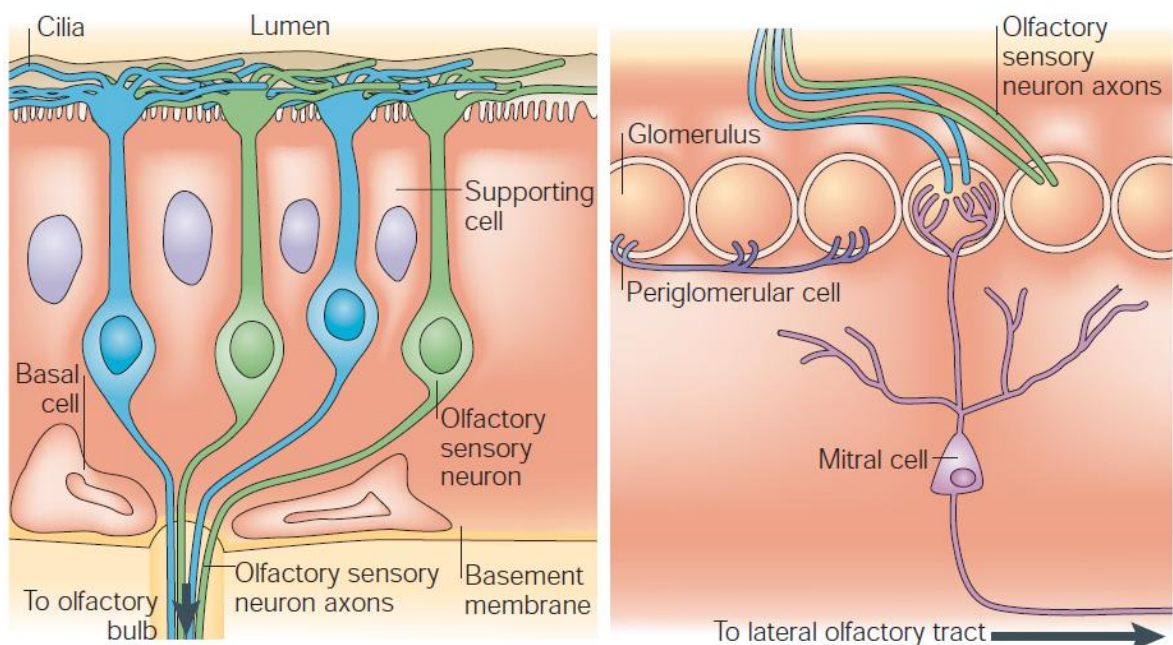


Figura 2. Diagrama esquemático com os principais neurônios presentes no BO. A transmissão da informação é feita através das células sensoriais e das células mitrais/tufosas, já a modulação dessa informação é realizada através das células periglomerulares. Retirado de Mombaerts, 2004.

A discriminação entre diferentes odores requer que o encéfalo determine quais desses receptores e, conseqüentemente, neurônios, são ativados por um dado estímulo olfatório, uma vez que um neurônio sensorial expressa apenas um único tipo de receptor específico a uma determinada molécula de odor dentre um repertório de aproximadamente 1000 receptores (BUCK, 2000; SERIZAWA, MIYAMICHI e SAKANO, 2004). Uma vez que há uma grande quantidade de genes que expressam diferentes tipos desses receptores, a possibilidade de combinação de receptores odoríferos é bastante extensa, e, conseqüentemente, o número de odores que é possível de se detectar também o é, variando na literatura de 2.000 a

mais de 100.000 tipos diferentes de odores (FIRESTEIN, 2001). Além disso, para cada tipo odorífero há um padrão de ativação glomerular distinto, sendo que algumas moléculas específicas podem ativar glomérulos agrupados no domínio anteromedial do BO, enquanto outras ativam glomérulos no seu domínio lateral (MORI, 2003).

2.2 RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS DE MAMÍFEROS FRENTE A UM ODOR APETITIVO

A literatura relata que a preferência de um indivíduo por um odor agradável é fortemente modulada pela sua experiência e aprendizagem, no entanto, tal comportamento parece ser pré-determinado em algum nível pelas propriedades físico-químicas das moléculas odoríferas que tornam um determinado odor mais atrativo que outro. Além disso, um estudo de Mandairon e colaboradores (2009) apontou que seres humanos e camundongos possuem preferências olfatórias semelhantes frente a diferentes odores. Portanto, a preferência por um odor apetitivo parece ser uma característica conservada entre espécies, uma questão que parece estar acima de fatores importantes como a quantidade de exposições a determinado odor ou da experiência de vida do indivíduo (PRESCOTT, KIM e KIM, 2008; MANDAIRON et al., 2009). O circuito neuronal pelo qual a preferência olfatória é processada em humanos ainda não está esclarecido, porém sabe-se que, no que orienta o comportamento sexual e social em ratos, os neurônios que partem do epitélio olfatório e do OVN projetam-se para o núcleo cortical e medial da amígdala, respectivamente, e os neurônios que ali residem projetam-se à área pré-óptica do córtex encefálico (DHUNGEL et al., 2011).

Diversos odores têm sido descritos na literatura como capazes de induzir respostas hedônicas em roedores, respostas estas quantificadas através de diferentes testes de preferência olfatória. O estudo de Cho e colaboradores (2017) utilizou manteiga de amendoim para avaliar o tempo em que camundongos levavam para localizar a fonte do odor apetitivo enterrada dentro da caixa do animal, uma vez que é um odor de fácil obtenção e que gera respostas reprodutíveis, e observaram que animais controles tiveram um tempo de busca pelo odor muito menor em relação aos animais com anosmia. Outros estímulos apetitivos capazes de ativar o sistema olfatório principal e levar a respostas hedônicas já foram utilizados, como

cookies, cereais adoçados tais como *Froot Loops* (cereais adocicados), *chips* de chocolate, pedaços de queijo ou urina de camundongo fêmea, podendo-se avaliar também o tempo de *sniffing* (investigação olfatória) do animal frente à presença do odor (JAKUPOVIC, KANG e BAUM, 2008; YANG e CRAWLEY, 2009).

Tais testes são importantes para a caracterização comportamental de prazer do animal, uma vez que a sua motivação e curiosidade intrínseca podem ser fatores de confusão quando se pretende avaliar os níveis de discriminação de um odor ou outro (ZOU et al., 2015). No entanto, alguns fatores podem influenciar na resposta hedônica do animal frente ao estímulo odorífico, tal como demonstrou Zolotykh e Kozhevnikova (2017) através da observação de que, apesar de a urina de camundongos fêmeas mostrar-se um odor atrativo aos machos da mesma espécie, a experiência sexual ou social prévia que o animal possui representa um importante fator modulador da preferência olfatória desse animal frente ao odor, sendo que animais machos sem contato sexual prévio com fêmeas não parecem demonstrar preferência olfatória pelo seu odor. Tal efeito também foi demonstrado em ratos, sendo também verificado que, em animais sexualmente ativos, ocorre o recrutamento de áreas neuronais envolvidas com a via vomeronasal e também o núcleo *accumbens* no processamento do odor (HOSOKAWA e CHIBA, 2005).

2.3 RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS DE MAMÍFEROS FRENTE A UM ODOR DE PREDADOR

A exposição aguda de ratos a um odor de predador causa redução significativa na atividade locomotora do animal, além de aumentar a imobilidade e diminuir comportamentos como o *grooming* e também o seu comportamento reprodutivo (MCGREGOR et al., 2002; APFELBACH et al., 2005). As vias específicas pelas quais as moléculas odoríficas do predador desencadeiam tais respostas permanecem desconhecidas, porém alguns odores de teor aversivo, como a urina e a saliva de mamíferos, foram vistos como sendo capazes de estimular o sistema neuronal do bulbo olfatório acessório por meio da ativação de neurônios vomeronasais presentes neste sistema, de forma a decodificar o estado sexual e genético do organismo provedor do odor (BEN-SHAUL et al., 2010).

Sabe-se que, dentre os odores de predador já conhecidos na literatura, um dos mais estudados em roedores é o 2,5-diidro-2,4,5-trimetiltiazol (TMT), identificado pela primeira vez há 40 anos nas fezes de raposas (VERNET-MAURY, 1980). Outro estudo demonstrou que a 2-feniletilamina, uma molécula encontrada na urina de animais carnívoros, é capaz de estimular neurônios localizados principalmente na porção dorsal do epitélio olfatório e, assim como o TMT, é capaz de induzir um aumento de corticosterona no plasma de ratos concomitante à deflagração de uma resposta fortemente aversiva (FERRERO et al., 2011). Esta resposta inata frente ao estímulo proveniente da 2-feniletilamina e de outras moléculas voláteis da urina de predador parece depender especialmente da ativação do glomérulo TAAR4, mostrando a importância desta família na detecção sensível de aminas aversivas tanto por humanos quanto por diversas outras espécies de vertebrados que mantêm o seu repertório de receptores TAAR (receptores associados a traços de aminas) conservado ao longo da evolução (NEI, NIIMURA e NOZAWA, 2008; DEWAN et al., 2013). Além disso, existe uma relação íntima entre os receptores TAAR1 e os níveis de DA no sistema olfatório, uma vez que a ativação desses receptores parece levar à modulação dos receptores D2 e a uma redução na liberação de DA pelo sistema, demonstrando uma ação regulatória dos traços de aminas sobre a transmissão dopaminérgica associada à informação olfatória (LEO et al., 2014).

Apesar de ter sido demonstrado na literatura que o TMT é uma substância capaz de ativar tanto respostas de aversão quanto de medo dependendo das suas concentrações (FENDT e ENDRES, 2008), um estudo publicado por Staples e colaboradores (2008) mostrou que o TMT não é capaz de ativar o sistema olfatório acessório dos animais e, da mesma forma, não foi observada a capacidade dessa substância de ativar áreas hipotalâmicas responsáveis por desencadear um comportamento de medo em ratos, como o núcleo pré-mamilar dorsal, a parte dorsomedial do hipotálamo ventromedial e o hipotálamo anterior. No entanto, ainda neste estudo, o TMT induziu a uma redução do *rearing* (comportamento do animal de ficar apoiado nas patas traseiras) nos ratos, sem manifestarem tentativas de escape ou redução do *grooming*, indicando que ele pode estar envolvido com a transmissão de uma informação nociva ao animal e não propriamente com a transmissão de informação de perigo pela presença de um predador (STAPLES et al., 2008).

Em paralelo a isso, vários estudos já demonstraram uma resposta de aversão e medo em roedores induzida pela exposição ao odor de gato, seja pela este proveniente do pelo ou da pele do animal, associando tais comportamentos à ativação de estruturas envolvidas com o processamento do comportamento defensivo, como o núcleo pré-mamilar dorsal, a amígdala medial, a parte dorsomedial do hipotálamo ventromedial e o hipotálamo anterior (DIELENBERG, HUNT e MCGREGOR, 2001; APFELBACH et al., 2005; STAPLES e MCGREGOR, 2006). Levando em conta que algumas dessas estruturas estão envolvidas com o sistema olfatório acessório das presas, sugere-se que o odor de gato seja processado como um composto semelhante a um feromônio por este sistema (STAPLES et al., 2008). Em estudos similares demonstrou-se que o odor de gato é capaz de levar a um comportamento de *freezing* em animais e de aumentar o tempo em que ratos Wistar permanecem escondidos na sessão do teste, além de passar menos tempo investigando o estímulo odorífero e percorrendo o ambiente, relacionando estes comportamentos a uma resposta ansiogênica e defensiva frente ao perigo (MCGREGOR et al., 2002; MAY et al., 2012). Diante disso, o odor de gato torna-se um componente interessante para analisar respostas comportamentais inatas de roedores frente a um estímulo aversivo oriundo de odor de predador, o que é corroborado por estes estudos.

2.4 DISTÚRPIO OLFATÓRIO NA DOENÇA DE PARKINSON

Algumas doenças neurodegenerativas apresentam como um dos sintomas frequentemente relatados pelos pacientes algum grau de prejuízo olfatório, como, por exemplo, DP (DOTY, 2012). A DP é considerada uma doença predominantemente idiopática que se caracteriza pela combinação de sintomas motores que norteiam o diagnóstico, tais quais tremores, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural (AMINOFF, 1994), e o seu fenótipo motor é devido principalmente à morte de neurônios dopaminérgicos presentes na SNpc, a qual envia sinais para o corpo estriado e outros núcleos dos gânglios da base sob condições normais (BARRAUD et al., 2009). Sabe-se também que tal perda de neurônios dopaminérgicos é acompanhada pelo acúmulo de fibrilas de α -sinucleína denominadas de corpúsculos de Lewy em várias regiões cerebrais, resultando em

disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, desregulação do citoesqueleto e neuroinflamação, culminando assim na neurodegeneração característica da doença (LANG e LOZANO, 1998).

Por muito tempo, estudaram-se apenas os sintomas motores clássicos envolvidos na DP e não se detinha informações precisas a respeito dos distúrbios não motores que os seus pacientes poderiam vir a manifestar. Em 1975, Ansari e Johnson publicaram um estudo que forneceu os primeiros dados acerca de possíveis prejuízos olfatórios presentes em alguns dos 22 pacientes com DP envolvidos na pesquisa (ANSARI e JOHNSON, 1975). Quando testada a acuidade olfatória dos indivíduos, observou-se que 10 deles tinham um significativo decréscimo na acuidade olfatória, sendo 4 destes tratados com L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Visto isso, os autores já discutiam a improbabilidade do tratamento com L-DOPA de restaurar a acuidade olfatória nesses pacientes. De fato, atualmente sabe-se que os medicamentos utilizados para tratar a DP não são capazes de produzir benefícios em relação aos prejuízos olfatórios (CHAUDHURI et al., 2006), e que outras alternativas farmacológicas para estes são requeridas.

Os sintomas não motores relacionados à DP, analisados mais tardiamente, vieram a ser foco de diversas pesquisas recentes. Sabe-se hoje que tais sintomas estão envolvidos com a neurodegeneração de outras estruturas que não a SNpc, como, por exemplo, o BO e o núcleo olfatório anterior, o que corresponde ao estágio 1 da progressão da doença de acordo com Braak e colaboradores (2003). Além disso, no estágio 2 há o envolvimento de outras estruturas, tais como os núcleos da rafe, *locus coeruleus* e o núcleo pedunculopontino (BRAAK et al., 2003; CHAUDHURI et al., 2006). Estes dois primeiros estágios estão inseridos na fase pré-motora da doença e sintomas, como a hiposmia em muitos pacientes, podem servir como biomarcadores para um diagnóstico precoce da DP (HAEHNER, HUMMEL e REICHMANN, 2009), enquanto os sintomas motores clássicos, de acordo com os estágios de Braak, acometem os pacientes apenas nos estágios 3 e 4 da doença (BRAAK et al., 2003).

Em um estudo epidemiológico publicado por Ross e colaboradores (2007), em que acompanhou mais de 2.000 homens ao longo de 8 anos, observou-se que os prejuízos olfatórios estão associados com uma maior chance de um indivíduo ser diagnosticado com DP dentro de 4 anos. Assim, a neurodegeneração progressiva

característica da DP reflete claramente nos prejuízos olfatórios advindos inicialmente da doença. De fato, é possível verificar uma mudança citoestrutural no BO de pacientes com DP em relação a pessoas saudáveis (CAVE et al., 2016). A perda de células específicas do BO parece permear estas mudanças, uma vez que as células mitrais/tufosas e os interneurônios que expressam calretininas estão diminuídos em pessoas com DP com algum tipo de prejuízo olfatório, enquanto que os interneurônios que expressam tirosina hidroxilase (TH), presentes na camada glomerular, não estão (CAVE et al., 2016). Além disso, o BO é uma das primeiras regiões cerebrais a apresentar acúmulo de corpúsculos de Lewy, o que pode justificar tais mudanças citoestruturais e o aparecimento prévio ao diagnóstico dos sintomas de hiposmia e anosmia nos pacientes com DP (BRAAK et al., 2003).

O estudo de Huisman e colaboradores (2004) demonstrou um aumento bastante significativo no número de neurônios TH-imunorreativos no BO de pacientes parkinsonianos, o qual foi relacionado então a um aumento na atividade da DA nessa região. Uma vez que a DA possui um efeito inibitório sobre as células envolvidas com a transmissão da informação olfatória, o seu aumento em uma situação de DP seria uma resposta compensatória ao desequilíbrio de DA na SNpc que poderia explicar então o aparecimento do quadro de hiposmia presente nos pacientes (HUISMAN et al., 2004; RODRIGUES et al., 2004; AURICH et al., 2017). Somado a isto, o estudo de Rodrigues e colaboradores (2014) demonstrou que a modulação do receptor D2 no BO parece permear este processo, uma vez que, em modelo de Parkinsonismo, a sua ativação é associada a uma supersensibilidade dopaminérgica desencadeada pela neurotoxina rotenona e também pela privação de sono REM (movimentos oculares rápidos), de forma a facilitar a neurotransmissão GABAérgica dos neurônios periglomerulares e podendo levar assim a uma redução na habilidade de discriminar odores.

2.5 MODELOS ANIMAIS DE PARKINSONISMO

A rotenona é um inseticida e pesticida membro dos rotenóides que inibe o complexo mitocondrial I e que possui um modo de ação em comum com o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), que também é uma neurotoxina utilizada para mimetizar a DP em animais (SANDERS e GREENAMYRE, 2013). Ela é uma

substância bastante lipofílica, podendo facilmente atravessar a barreira hematoencefálica e se acumular em organelas intracelulares como a mitocôndria, induzindo a geração de espécies reativas de oxigênio e a apoptose neuronal, ou seja, a degeneração de neurônios dopaminérgicos pelo acúmulo de danos oxidativos. E, além disso, a rotenona tem a capacidade de bloquear a mitose e a proliferação celular por induzir a despolimerização dos microtúbulos celulares (BOVÉ e PERIER, 2012). Testes com a exposição à rotenona em roedores fornecem um modelo interessante para estudar os mecanismos referentes à injúria induzida por toxina em neurônios dopaminérgicos, podendo, portanto reproduzir quase todos os aspectos patológicos da DP, como a formação de inclusões celulares (JAGMAG et al., 2016). Neste modelo, a inibição exacerbada do complexo mitocondrial I produz uma degeneração seletiva do sistema nigroestriatal ligado à DA e reproduz os aspectos patológicos observados nos estágios iniciais da PD, os quais podem ser observados uma semana após a administração da droga e abrangem os sintomas não motores característicos da DP, como o prejuízo olfatório (DOS SANTOS et al., 2013; BASSANI et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014).

O modelo de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) é também largamente utilizado para estudar a patogênese da DP, uma vez que a neurotoxina é capaz de produzir uma degeneração nigroestriatal com a presença manifestações motoras bastante semelhantes aos de um paciente parkinsoniano, permitindo assim uma avaliação comportamental de animais frente a um estágio mais avançado da doença (DUTY e JENNER, 2011). A 6-OHDA é encontrada na urina dos pacientes com DP e frequentemente em pacientes que fazem uso de L-DOPA, como produto do seu catabolismo, e ela é capaz de se acumular no citosol e de induzir uma cascata oxidativa no interior das células (CURTIUS et al., 1974; NGEMA e MABANDLA, 2017). Uma vez que a 6-OHDA é uma substância hidrofílica e não consegue atravessar eficientemente a barreira hematoencefálica, ela necessita ser injetada diretamente na SNpc para iniciar uma neurodegeneração progressiva na região. Ao entrar na célula através dos transportadores de DA e noradrenalina (NA), ocorre a sua auto-oxidação, o que leva à formação de espécies reativas de oxigênio, peróxido de hidrogênio e quininas (JAGMAG et al., 2016). Além disso, a 6-OHDA gera redução da capacidade antioxidante, aumento dos níveis de ferro no sistema nervoso e inibição da cadeia respiratória mitocondrial, o que desencadeia uma

resposta inflamatória, dano e morte neuronal (DUTY e JENNER, 2011).

O medicamento Zicam® é um conhecido agente intranasal à base de zinco utilizado para tratar os sintomas comuns da gripe, como a congestão nasal (HIRT et al., 2000). Muitos estudos clínicos e experimentais envolvendo testes *in vivo* e *in vitro* demonstraram a sua capacidade de desencadear um efeito citotóxico sobre o neuroepitélio olfatório, levando à morte dos neurônios sensoriais olfatórios presentes no sistema olfatório principal e a uma disfunção irreversível na capacidade olfativa, com presença de anosmia ou hiposmia em pacientes que tiveram o seu uso (ALEXANDER e DAVIDSON, 2006; LIM et al., 2009). Além disso, foi verificado que dois meses após o tratamento com o Zicam® houve perda completa ou quase completa da mucosa e do epitélio olfatório em camundongos (LIM et al., 2009). Esse medicamento pode ser utilizado, portanto, como ferramenta farmacológica para o prejuízo olfatório, uma vez que há relatos da perda da discriminação olfatória em ratos e camundongos com lesão do epitélio olfatório por Zicam®, funcionando como um controle positivo para o prejuízo (CHIOCA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Os experimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes preconizadas pelo CEUA/BIO da Universidade Federal do Paraná que sustentam a aplicação de modernos princípios éticos em relação ao uso de animais de experimentação sob o nº #1114 (anexo 1). Foram utilizados ratos Wistar machos de 3 meses de idade, pesando entre 280-330g. Os animais foram mantidos em uma sala com umidade e temperatura controladas ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), em um ciclo de claro-escuro de 12:12h (7:00-19:00h). Água e comida foram fornecidas à vontade aos animais durante todo o experimento.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado de acordo com o delineamento ilustrado a seguir (figura 3). Para a realização dos testes olfatórios, os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: Naive (n=10), Zicam (n=10), Sham (n=10), Rotenona (n=10) e 6-OHDA (n=10), com um total de 50 animais para este experimento.

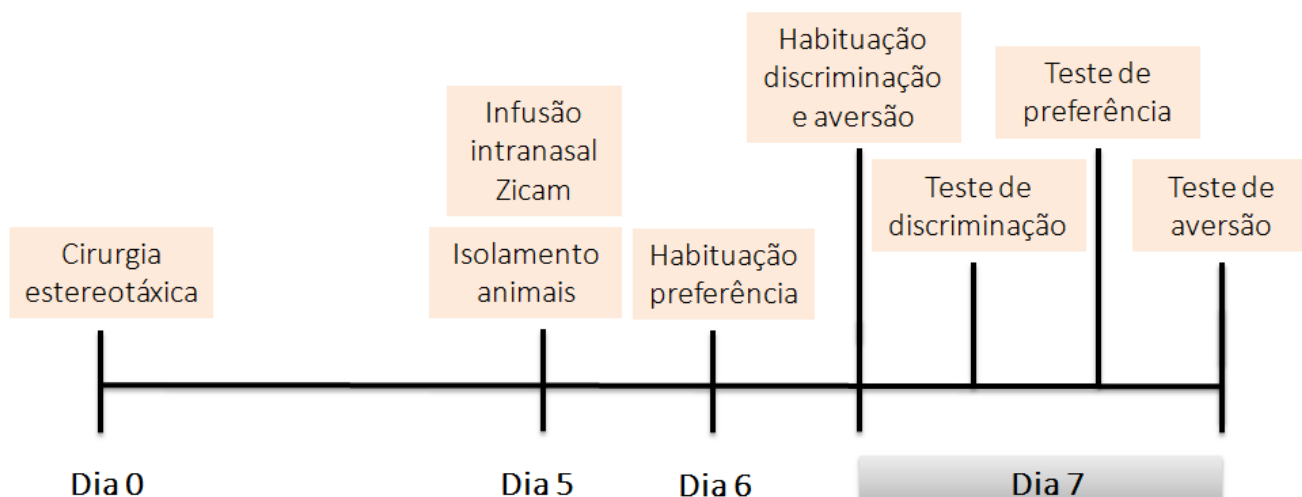


Figura 3. Representação esquemática do delineamento experimental. No dia 0, os animais do grupo Sham, Rotenona e 6-OHDA foram submetidos à cirurgia estereotáxica para infusão das neurotoxinas rotenona, 6-OHDA ou veículo (dimetilsulfóxido - DMSO) na SNpc. No dia 5, foi realizada a administração intranasal da droga Zicam® nos animais do grupo Zicam (controle positivo para o prejuízo olfatório) e os animais de todos os grupos foram isolados em caixas-moradias para a realização do teste de discriminação social (dia 7). No dia 6, os animais passaram pela habituação do teste de preferência, com duração de 20min, para a realização do respectivo teste no dia seguinte. No dia 7 (20h após a habituação), foi realizada a habituação do teste de discriminação e de aversão, para a realização subsequente do teste de discriminação olfatória, seguido do teste de preferência olfatória e, por fim, do teste de aversão ao odor em cada grupo. Após a conclusão do experimento, os animais foram eutanasiados.

3.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram sedados com xilazina intraperitoneal (10mg/kg; Syntec do Brasil Ltda, Brasil) e anestesiados com quetamina intraperitoneal (90mg/kg; Syntec do Brasil Ltda, Brasil). Foram realizadas lesões na SNpc por meio da rotenona ou 6-OHDA. Para a lesão bilateral da SNpc com a neurotoxina rotenona ou 6-OHDA as coordenadas utilizadas foram as seguintes, tendo bregma como referência: SNpc (AP)=-5,0mm, (ML)=±2,1mm e (DV)=-8,0mm (PAXINOS E WATSON, 2005). As agulhas foram guiadas para a região de interesse para a infusão bilateral de 1µL neurotoxina rotenona (12µg/µL), ou 2µL 6-OHDA (Sigma-Aldrich®, EUA) (3µg/µL), utilizando uma bomba de infusão eletrônica (Insight Instruments, Ribeirão Preto, Brasil), com uma taxa de infusão de 0,33µL/min para rotenona e 6-OHDA. Já nos animais do grupo sham foi injetada uma solução de 2µL DMSO/salina+ascorbato (50/50%) (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) em igualdade de condições.

3.4 ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE GLUCONATO DE ZINCO+SOLUÇÃO DE ACETATO DE ZINCO (ZICAM®)

A administração de Zicam® Oral Mist™ (Matrixx Initiatives, Scottsdale, AZ, EUA) foi feita conforme já descrito por Chioca e colaboradores (2013) e Rodrigues e colaboradores (2014). Os animais foram primeiramente sedados com quetamina (90mg/kg) e xilazina (3mg/kg) via intraperitoneal. Após isso, com o auxílio de uma seringa Hamilton conectada a uma agulha de calibre 30 através de um tubo de polietileno, 30µL da solução de Zicam foi entregue lentamente à cavidade nasal do animal. A agulha foi inserida 15mm através da narina externa direita para ajudar a irrigar o epitélio olfatório, sendo realizado o mesmo procedimento na narina externa esquerda. Durante a respiração, parte da solução foi expelida através da narina e secada com um papel absorvente para permitir que o animal continuasse respirando.

3.5 TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA

O teste de discriminação olfatória (TDO), também chamado de teste de discriminação social, foi previamente descrito por Soffié e Lamberty (1988), posteriormente, modificado por Prediger e colaboradores (PREDIGER, BATISTA e TAKAHASHI, 2005; PREDIGER, FERNANDES e TAKAHASHI, 2005). Os ratos foram isolados em caixas-moradias por 48h antes do teste, e o cepilho de cada animal foi então utilizado para o teste. Foi feita a habituação do animal testado por 2 minutos em uma caixa dividida em dois compartimentos iguais, com a presença de cepilho limpo em ambos os lados da caixa. Imediatamente após a habituação, foi realizado o teste com odor do próprio animal com a presença de cepilho limpo em um dos compartimentos (compartimento 1; não familiar) e do cepilho em que o rato havia sido isolado no segundo compartimento (compartimento 2; familiar), por 3 minutos. Esta caixa possui dimensões de 60x40x50cm, paredes opacas e abertura na parte superior com a presença de um fluxo laminar constante para ventilação do aparato, sendo utilizada também para os demais testes. Foi quantificado o tempo de permanência do animal em cada um dos compartimentos tanto na habituação (2min)

quanto no teste (3min), sendo seu comportamento gravado por meio de uma câmera digital para posterior análise.

3.6 TESTE DE PREFERÊNCIA AO ODOR APETITIVO

Esse teste foi uma adaptação de Cho e colaboradores (2017). No dia anterior ao teste, foi feita habituação de 20 minutos em uma caixa dividida em dois compartimentos iguais, interligados por uma porta com cepilho limpo em ambos os lados, sendo colocado em ambos os lados um tubo falcon perfurado contendo em seu interior um papel de filtro umedecido com 100µl de um odor apetitivo (0,6g de creme de amendoim diluídos em 1mL de água destilada). Após 20h, no dia seguinte, foi realizado o teste com duração de 3 minutos no mesmo aparato, tendo presente cepilho limpo nos dois compartimentos, além de um tubo falcon contendo papel de filtro com o odor neutro (100µl de água destilada) em um dos compartimentos e um tubo falcon contendo papel de filtro com o mesmo odor apetitivo da habituação (100µl de 0,6g de manteiga de amendoim diluídos em 1ml de água destilada) no outro compartimento. O tempo de permanência dos animais nos dois compartimentos foi quantificado e gravado para posterior análise tanto na habituação quanto no teste, sendo registrados e analisados na habituação (20min) os três primeiros minutos.

3.7 TESTE DE AVERSÃO AO ODOR

Este teste foi uma adaptação de Staples e McGregor (2006). Cada animal foi colocado em uma caixa dividida em dois compartimentos iguais contendo cepilho limpo em ambos os compartimentos para a realização do teste com duração de 3 minutos. Em um dos compartimentos, houve a presença de um tubo falcon contendo em seu interior um pedaço (60mm) de uma coleira de fibra sintética utilizada, por aproximadamente 6 semanas, por um gato macho doméstico, castrado e com idade próxima de 1 ano e meio. No outro compartimento houve a presença de um tubo falcon perfurado contendo em seu interior uma coleira idêntica, entretanto, sem a presença do odor de gato. No dia anterior ao teste, a coleira foi retirada do gato e foi

reservada dentro de um frasco hermeticamente fechado para a realização do teste no dia seguinte. Além disso, pedaços iguais da mesma coleira foram utilizados para testar todos os animais, sendo que para cada animal foi utilizado um pedaço diferente, e a coleira foi reservada dentro do mesmo frasco durante os intervalos do teste. O teste (3min) foi gravado por meio de uma câmera digital para posterior análise, no qual o comportamento de *freezing* e o tempo de permanência do animal em cada compartimento foram quantificados.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos dos testes de preferência, discriminação e aversão ao odor foram analisados por meio de Análise de Variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Fisher, sendo as variáveis o tempo de permanência do animal em cada compartimento e a lesão. O tempo de *freezing* de cada animal no teste de aversão ao odor foi analisado por meio de ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Fisher. O nível de significância considerado para a acuidade olfatória foi de $P \leq 0,05$ e os valores foram expressos como média \pm S.E.M.

4. RESULTADOS

4.1 TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA

A fim de realizar o teste de discriminação olfatória e o teste de aversão ao odor, foi realizada uma habituação prévia dos animais ao aparato, e os resultados estão demonstrados no gráfico a seguir (figura 4). Verificou-se uma diferença significativa entre o tempo de exploração do compartimento 1 e o tempo de exploração do compartimento 2 nos seguintes grupos: Naive ($P \leq 0,001$), Sham ($P \leq 0,001$), Rotenona ($P \leq 0,001$) e 6-OHDA ($P \leq 0,05$) [$F(1,80)=59,67$, $P < 0,0001$], indicando que houve uma maior permanência dos animais destes grupos no compartimento 2 do aparato ao longo da habituação. Ao contrário do que foi observado nos demais grupos, os animais do grupo Zicam não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre o tempo de exploração em cada compartimento. Também não se verificaram diferenças significativas na exploração dos compartimentos entre os grupos.

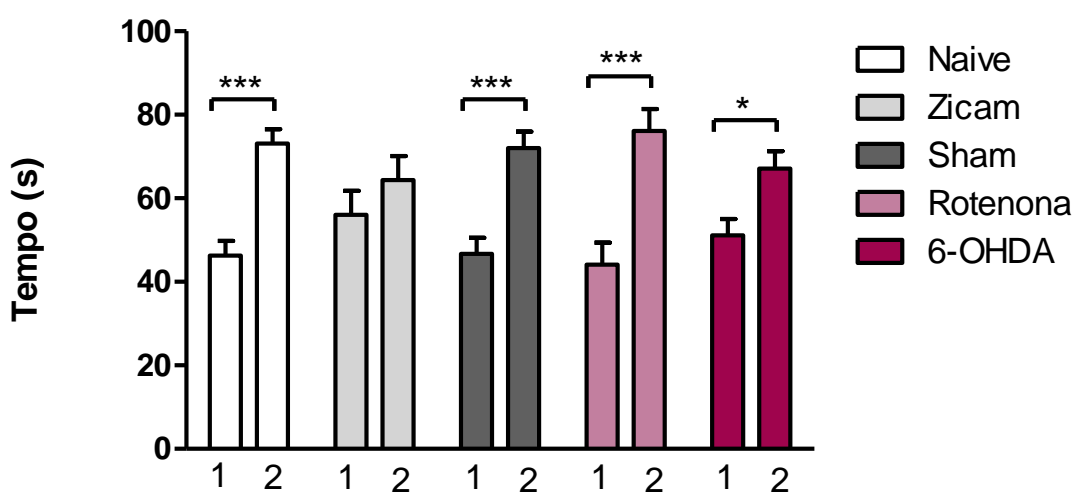


Figura 4. Habituação para o teste de discriminação olfatória e para o teste de aversão ao odor. Tempo de exploração (s) dos animais dos grupos Naive ($n=10$), Zicam ($n=10$), Sham ($n=10$), Rotenona ($n=10$) e 6-OHDA ($n=10$) no compartimento 1 e no compartimento 2 do aparato. As barras representam a média \pm EPM. 1=compartimento 1 (direita); 2=compartimento 2 (esquerda). * $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$ comparando a média de tempo de permanência dos animais em cada compartimento. ANOVA de duas vias seguida por teste *post hoc* de Fisher.

Já em relação ao teste de discriminação olfatória, foi observada uma diferença significativa de exploração dos compartimentos nos grupos Naive ($P \leq 0,01$), Rotenona ($P \leq 0,001$) e 6-OHDA ($P \leq 0,01$), [$F(1,76)=22,60$, $P < 0,0001$], sendo que estes grupos permaneceram mais tempo no compartimento com odor

familiar (2) quando comparado com o tempo de permanência no compartimento não familiar (1) (figura 5). O grupo Zicam manteve seu padrão de comportamento semelhante à habituação, não tendo permanecido mais tempo em um compartimento específico. Assim como o grupo Zicam, o grupo Sham não teve diferença no tempo de exploração entre os compartimentos, diferentemente do que foi observado na habituação com relação a este mesmo grupo. Também se pôde constatar uma diferença significativamente maior entre o tempo de exploração tanto do compartimento 1 quanto do compartimento 2 no grupo Rotenona em relação aos grupos Zicam [$F(4,76)=6,118$, $P=0,0003$] ($P\leq 0,01$) e Sham ($P\leq 0,01$).

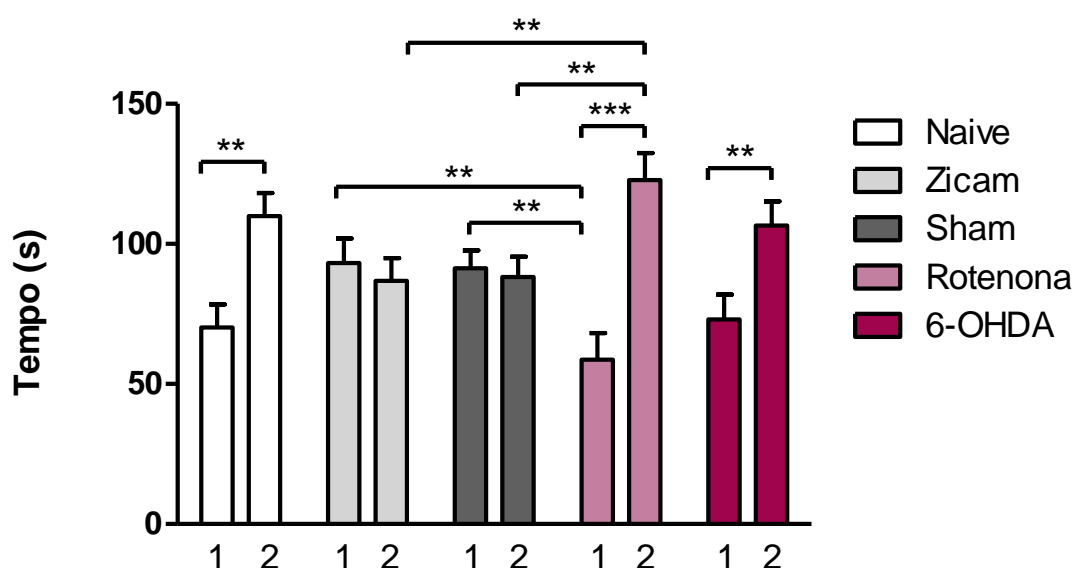


Figura 5. Teste de discriminação olfatória. Tempo de exploração (s) dos animais dos grupos Naive (n=10), Zicam (n=10), Sham (n=10), Rotenona (n=10) e 6-OHDA (n=10) no compartimento 1 (não familiar) e no compartimento 2 (familiar) do aparato. As barras representam a média±EPM. 1=compartimento 1 (direita); 2=compartimento 2 (esquerda). ** $P\leq 0,01$, *** $P\leq 0,001$ comparando a média de tempo de permanência dos animais em cada compartimento. ANOVA de duas vias seguida por teste *post hoc* de Fisher.

4.2 TESTE DE PREFERÊNCIA AO ODOR APETITIVO

Para realizar o teste de preferência ao odor apetitivo, executou-se previamente uma habituação específica para o teste, com duração de 20min e com a presença de odor de creme de amendoim em ambos os lados do aparato. Como se pôde observar através da figura 6, apenas os grupos Naive ($P\leq 0,001$) e Zicam ($P\leq 0,001$) tiveram uma diferença nos tempos de exploração do compartimento 1 e 2

[$F(1,80)=24,01$, $P<0,0001$], com uma permanência maior no compartimento 2 (esquerda) no teste. Os dois grupos que foram submetidos à lesão na SNpc (Rotenona e 6-OHDA) e o grupo Sham não tiveram uma preferência por um compartimento específico, uma vez que o tempo de exploração entre os compartimentos foi semelhante em estes grupos.

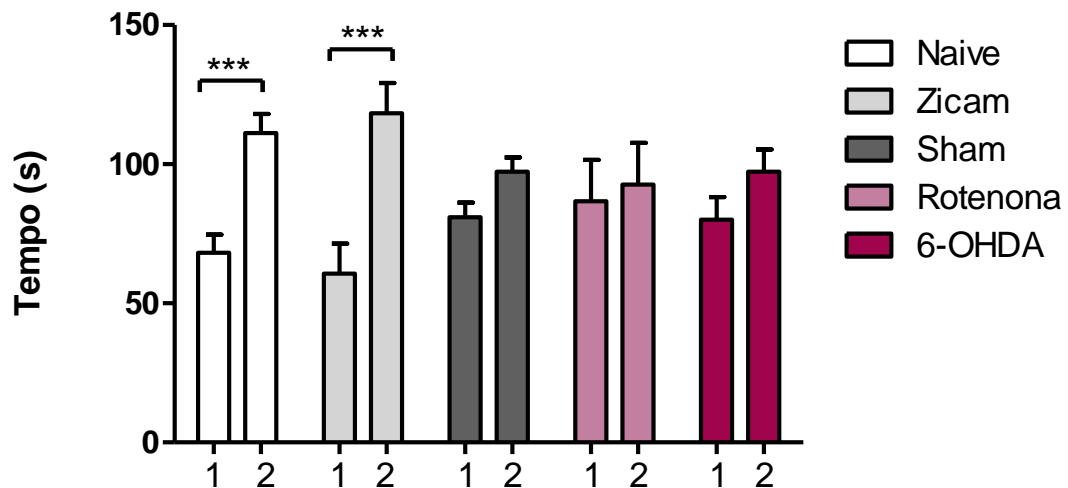


Figura 6. Habituação para o teste de preferência ao odor apetitivo. Tempo de exploração (s) dos animais dos grupos Naive (n=10), Zicam (n=10), Sham (n=10), Rotenona (n=10) e 6-OHDA (n=10) no compartimento 1 e no compartimento 2 do aparato. As barras representam a média \pm EPM. 1=compartimento 1 (direita); 2=compartimento 2 (esquerda). *** $P\leq 0,001$ comparando a média de tempo de permanência dos animais em cada compartimento. ANOVA de duas vias seguida por teste *post hoc* de Fisher.

Em sequência, foi realizado o teste com a presença do odor apetitivo em apenas um dos lados do aparato (compartimento 2). Os resultados estão apresentados na figura 7, que revela uma homogeneidade no tempo de exploração relativo aos grupos Naive, Zicam, Sham e 6-OHDA, uma vez que nenhum deles diferiu significativamente um compartimento do outro e todos apresentaram tempos de exploração para cada compartimento semelhantes entre si. Apenas o grupo Rotenona veio a apresentar uma diferença no tempo de exploração de ambos os compartimentos ($P\leq 0,05$).

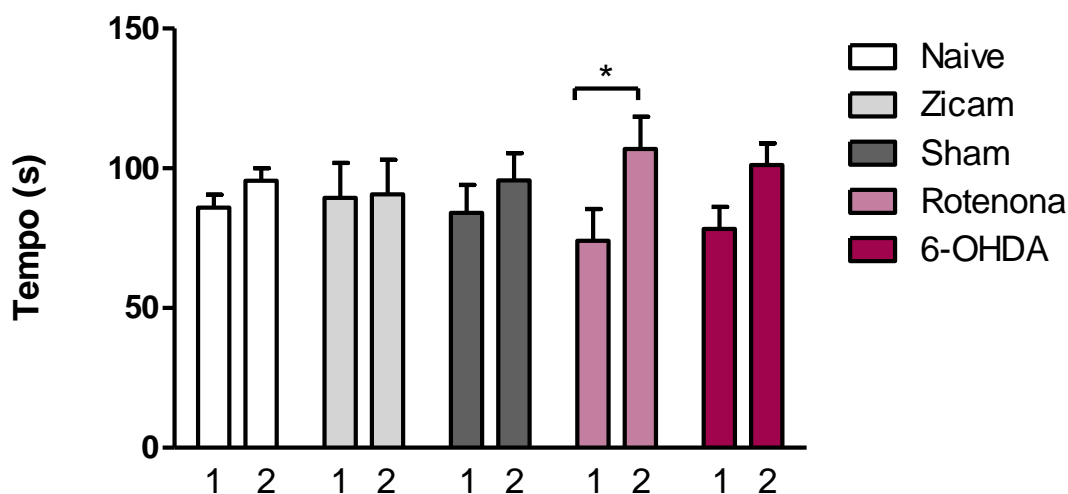


Figura 7. Teste de preferência ao odor apetitivo. Tempo de exploração (s) dos animais dos grupos Naive (n=10), Zicam (n=10), Sham (n=10), Rotenona (n=10) e 6-OHDA (n=10) no compartimento 1 (sem odor apetitivo) e no compartimento 2 (com odor apetitivo) do aparato. As barras representam a média±EPM. 1=compartimento 1 (direita); 2=compartimento 2 (esquerda). * $P \leq 0,05$, comparando a média de tempo de permanência dos animais em cada compartimento. ANOVA de duas vias seguida por teste *post hoc* de Fisher.

4.3 TESTE DE AVERSÃO AO ODOR

No teste de aversão ao odor, observou-se uma diferença estatisticamente significativa no tempo de exploração do compartimento 1 (sem odor de predador) e do compartimento 2 (com odor de predador) nos seguintes grupos: Sham ($P \leq 0,01$), Rotenona ($P \leq 0,001$) e 6-OHDA ($P \leq 0,01$), tendo os animais permanecido mais tempo explorando o compartimento 2 do que o 1 [$F(4,39)=3,104$, $P=0,0260$] (figura 8). Uma diferença no tempo de exploração do compartimento 2 também foi identificada no grupo Rotenona em relação ao grupo Naive e Zicam, sendo que o primeiro grupo explorou mais este compartimento do que os outros dois grupos ($P \leq 0,05$).

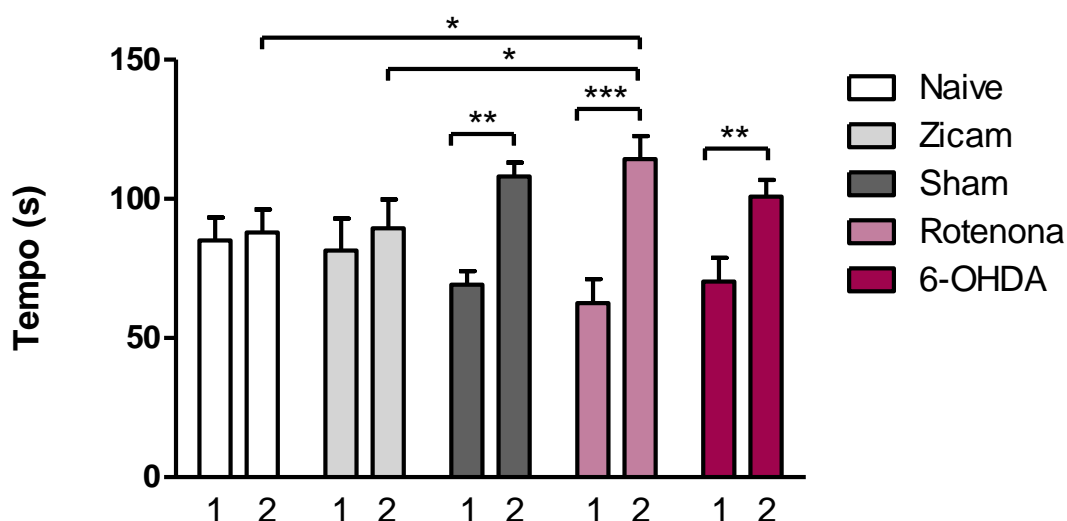


Figura 8. Teste de aversão ao odor. Tempo de exploração (s) dos animais dos grupos Naive (n=10), Zicam (n=10), Sham (n=10), Rotenona (n=10) e 6-OHDA (n=10) no compartimento 1 (sem odor aversivo) e no compartimento 2 (com odor aversivo) do aparato. As barras representam a média±EPM. 1 = compartimento 1 (direita); 2 = compartimento 2 (esquerda). * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ comparando a média de tempo de permanência dos animais em cada compartimento. ANOVA de duas vias seguida por teste *post hoc* de Fisher.

Quando analisado o tempo de *freezing* dos animais neste mesmo teste, verificou-se um maior tempo deste comportamento no grupo Naive e Sham em comparação aos grupos Rotenona ($P \leq 0,05$) e 6-OHDA ($P \leq 0,01$ e $P \leq 0,05$), com uma média de 23,6s para o primeiro grupo e de 18,8s para o segundo, o que foi estatisticamente significativo (figura 9). Entretanto, esta diferença significativa não foi observada, comparativamente ao Naive, para o grupo Zicam, o qual, todavia, apresentou uma média de tempo em *freezing* duas vezes menor do que o primeiro grupo. Tal resultado indica que o grupo Naive foi o que desencadeou uma resposta mais expressiva de medo frente ao odor de gato, seguido do grupo Sham, e que os demais grupos, principalmente os lesionados, apresentaram uma redução na sua capacidade olfatória e, conseqüentemente, na sua resposta perante o odor de predador.

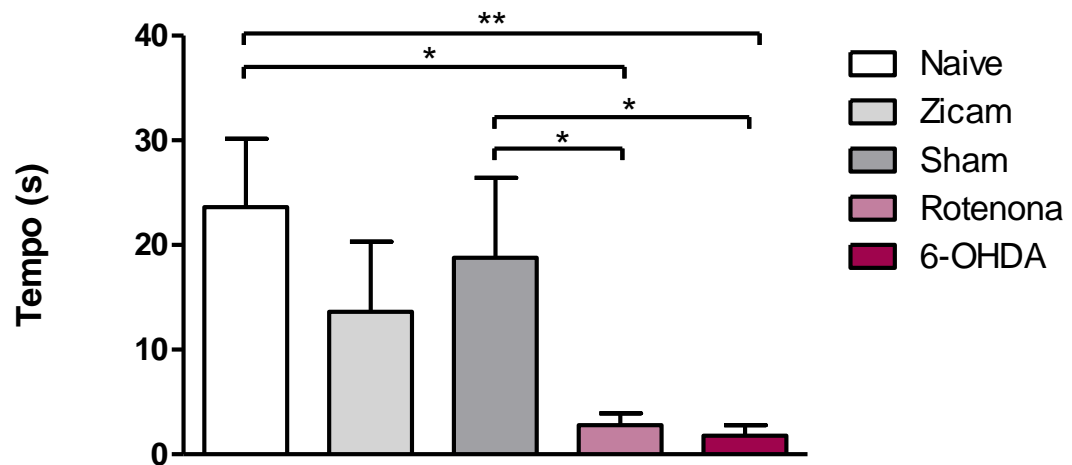


Figura 9. Teste de aversão ao odor. Tempo total de *freezing* dos animais dos grupos Naive (n=10), Zicam (n=10), Sham (n=10), Rotenona (n=10) e 6-OHDA (n=10) no aparato (compartimento 1+compartimento 2). As barras representam a média±EPM. *P≤0,05, **P≤0,01 comparando a média de tempo de *freezing* dos animais no teste. ANOVA de uma via seguida por teste *post hoc* de Fisher.

5. DISCUSSÃO

Foram realizados, neste trabalho, três diferentes tipos de testes olfatórios em modelos animais de Parkinsonismo: de discriminação social, de preferência ao odor apetitivo e de aversão ao odor, a fim de analisar as suas divergências e detectar possíveis diferenças comportamentais dos animais frente a odores distintos. O TDO baseou-se na utilização de um odor familiar dos animais, presente no cepilho em que o animal mantivera-se isolado 48h antes do teste, a fim de avaliar sua capacidade discriminativa através da olfação. Neste contexto, animais naive tendem a explorar um dos lados do aparato mais do que o outro na presença do próprio odor (PREDIGER et al., 2005a; PREDIGUER et al., 2005b; RODRIGUES et al., 2014), o que está em concordância com o que foi observado neste estudo. Tal tipo de odor social é encontrado na própria urina dos animais e, uma vez que uma grande variedade de substâncias voláteis e não voláteis estão presentes nele, ocorre tanto a ativação da via olfatória principal quanto da via acessória, com ambas apresentando funções complementares neste contexto (KELLER et al., 2009). Ainda, sabe-se que a via principal está precisamente envolvida no reconhecimento de moléculas de teor não social, enquanto que a segunda pode estar relacionada com o reconhecimento de moléculas de origens diversas, incluindo feromônios (MOMBAERTS, 2004). Sugere-se também que o OVN atue de certa forma independente do epitélio olfatório principal, sendo capaz de reconhecer certas substâncias voláteis na ausência da atividade da via principal (TRINH e STORM, 2003).

No mesmo teste, animais tratados com Zicam® tendem a explorar ambos os lados igualmente, visto que a droga acarreta em um prejuízo olfatório nos animais que faz com que a presença de um odor não seja apreendida por eles (CHIOCA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014), o que também foi observado neste estudo conforme os resultados apresentados. No entanto, ao contrário do que era esperado para os grupos com lesão intranigral (rotenona e 6-OHDA), observou-se que os animais destes grupos em geral tiveram um comportamento discriminativo semelhante ao grupo Naive. Tal fato, todavia, não deve ser atrelado à ideia de que os modelos de Parkinsonismo apresentaram uma discriminação e, portanto, não manifestaram um prejuízo da função, isto porque a habituação precedente ao teste revelou que os animais de todos os grupos, com exceção do grupo Zicam, já

apresentavam uma diferença prévia de exploração dos dois compartimentos. Esta diferença prévia indica claramente a presença de um fator externo à capacidade de discriminação em si, que pode ser colocado em termos de uma preferência exploratória dos animais àquele compartimento específico. Além disso, a via de administração utilizada também poderia influenciar no processo degenerativo iniciado pela neurotoxina e nas manifestações apresentadas pelos animais lesionados. Um estudo realizado por Sasajima e colaboradores (2015) utilizou rotenona intranasal em animais e verificou também uma redução da capacidade discriminativa, com concomitante estresse mitocondrial no BO desses animais. Entretanto, este estudo relatou uma diminuição de neurônios TH-positivos no BO após a lesão, enquanto outro estudo de Rodrigues e colaboradores (2014) demonstrou um aumento destes neurônios quando a mesma droga fora administrada via intranigral.

No entanto, se a hipótese da preferência por determinado ambiente for verdadeira, o mesmo se aplicará para o grupo Naive, refutando a ideia de que tal grupo cumpriu a tarefa provando ser capaz de discriminar os compartimentos. Um fator que possa estar induzindo a tal comportamento de preferência nos ratos é a duração da habituação prevista por este protocolo, apresentando-se bastante variável em estudos anteriores descritos na literatura que realizaram uma habituação precedente aos testes olfatórios (DIELENBERG, HUNT e MCGREGOR, 2001; KOBAYAKAWA et al., 2007; MAY et al., 2012; AURICH et al., 2017). Além disso, outro aspecto deve ser considerado, que diz respeito à preferência dos animais pelo próprio odor. Além da característica quase exclusiva da via olfatória acessória de detectar odores de cunho social, tal via é capaz de distinguir diferentes pistas dos odores sociais, como, em ratos, urina de fêmea da mesma espécie e de predador (BEN-SHAUL et al., 2010). Tal especificidade leva à ativação de diferentes padrões neuronais e consequentemente a diferentes manifestações comportamentais por estes animais. Dessa forma, um odor próprio pode assumir neles uma postura bastante distinta àquela frente a outro tipo de odor social, fazendo-os adotarem um grau variável de afinidade por aquele estímulo e de motivação para explorá-lo. Diferenças interindividuais também devem ser levadas em conta e, desse modo, o caráter de parcialidade que o teste de discriminação deve assumir pode acabar sendo desconstruído por conta da possível predileção pelo odor, embora a

preferência prévia pelo ambiente não tenha deixado claro esse efeito. Nesse sentido, uma análise comportamental prévia dos animais ao longo da habituação poderia permitir um desenho contrabalanceado do compartimento pelo qual o animal apresentou alguma preferência na habituação e o compartimento contendo a presença do odor no teste.

O teste de preferência pelo odor apetitivo foi realizado utilizando-se creme de amendoim como o odor de interesse. Assim como o creme de amendoim, outros odores que ativam o sistema olfatório principal de mamíferos já foram utilizados em estudos anteriores (LEE, LINSTER e DEVORE, 2013; CHAN et al., 2017), sendo possível confirmar se um odor desencadeia uma resposta consistente de preferência no animal ao se medir o tempo de investigação espontânea de pares de odores apresentados a ele simultaneamente (LEE, LINSTER e DEVORE, 2013). No estudo de AURICH e colaboradores (2017), por exemplo, foi demonstrada a capacidade do odor de limão de gerar respostas exploratórias em ratos Wistar, no entanto, o odor não foi relacionado a uma preferência olfatória, diferentemente do que se esperava com odor de creme de amendoim utilizado neste trabalho. Cho e colaboradores (2017) utilizou creme de amendoim em uma concentração de 0,6g/mL e observaram respostas exploratórias em camundongos, no entanto, o parâmetro utilizado envolveu o tempo que o animal levava para encontrar a fonte de odor enterrada no aparato coberto de cepilho. Além disso, uma restrição alimentar poderia ser capaz de aumentar a motivação dos animais na busca pela fonte do odor, enquanto que o livre acesso à comida poderia então levar à saciedade e a uma maior variação da motivação por estes animais (ZOU et al., 2015). Somado a isto, alguns autores discutem a importância e a necessidade da experiência prévia de um animal para a aquisição de preferência por um odor social em detrimento de outro (HOSOKAWA e CHIBA, 2005; PRESCOTT, KIM e KIM, 2008). Uma vez que os dados deste trabalho mostram a ausência de uma resposta direta dos animais frente ao odor apetitivo, um aprendizado associativo também parece ser importante nesse contexto para criar no animal uma relação direta entre as pistas do odor e a recompensa alimentar (ZOU et al., 2015).

De fato, um mecanismo que se mostra relevante nos modelos animais de DP induzida por rotenona e 6-OHDA está relacionado ao sistema olfatório acessório, uma vez que estudos passados realizando testes de discriminação com odor próprio

dos animais revelaram a presença de prejuízo significativo da função destes (PREDIGER et al., 2005a; PREDIGER et al., 2005b; RODRIGUES et al., 2014). No entanto, nunca se havia avaliado até o presente momento a discriminação olfatória de modelos animais de Parkinsonismo por meio de um odor aversivo proveniente de predador. Neste estudo, utilizou-se odor de gato para o teste de aversão, no qual o tempo de permanência em cada compartimento mostrou que o compartimento com odor foi incapaz de influenciar os grupos na escolha pelo lugar, enquanto o tempo de *freezing* pôde revelar um claro prejuízo da função olfatória nos animais lesionados por rotenona ou 6-OHDA. Uma vez que o seu tempo de *freezing* foi significativamente menor quando comparados com o grupo Naive e com o grupo Sham, e, dessa forma, não demonstraram uma resposta natural de medo frente ao perigo, atribui-se isto a um déficit no sistema olfatório acessório desses animais. Tal déficit é consequente da perda de neurônios dopaminérgicos da SNpc induzida pelas neurotoxinas rotenonas e 6-OHDA, que podem ser então responsáveis por afetar outras estruturas que são de fato acometidas pela DP em humanos, como o complexo corticomedial presente na amígdala, bastante envolvido com a decodificação da informação olfatória (HARDING et al., 2002). Sustentando isto, um estudo realizado por Höglinger e colaboradores (2015) revelou a presença de uma projeção direta de neurônios da SNpc para o BO, demonstrando a relação íntima mantida por estas duas estruturas e as consequências diretas para o BO caso um desbalanço de neurotransmissores provocados pela DP, tais como DA, NA e serotonina (5-HT), venha a ocorrer.

O mesmo teste ainda revela que o grupo Zicam apresentou um tempo de *freezing* menor em comparação com o grupo Naive e Sham, embora maior em relação aos grupos lesionados, porém de que forma este efeito poderia se relacionar com o acometimento do sistema acessório juntamente com o do sistema principal permanece desconhecido. Já os dados obtidos pelo grupo Naive e Sham corroboram com os da literatura, na qual já é consolidada a capacidade de moléculas inalatórias provenientes de alguns predadores de ativar o sistema acessório de suas presas com concomitante disparo do sistema nervoso central e aumento de cortisona, levando a manifestações de aversão e medo (FERRERO et al., 2011; NIELSEN et al., 2015). O odor de gato, mais especificamente, já havia provado sua eficiência em gerar resultados expressivos de diminuição da atividade

locomotora em ratos Wistar (DIELENBERG e MCGREGOR, 2001). Porém, uma vantagem da sua utilização em relação a outros odores está justamente ligada ao fato de atuar como uma substância *pheromone-like*, não volátil, fazendo com que ele persista ao longo do tempo na sua fonte de emissão e permitindo assim sua utilização contínua na execução de testes olfatórios (DIELENBERG e MCGREGOR, 2001). Em contrapartida, se um odor de caráter aversivo tal como de gato é capaz de promover a ativação do sistema acessório como uma substância *pheromone-like*, seria de se esperar que outros odores que ativassem essa mesma via, tais como urina de fêmea da mesma espécie, levassem a manifestações comportamentais típicas e evidentes de atração em animais machos naive com aparecimento do prejuízo olfatório em animais lesionados. No entanto, sabe-se que um odor de predador desencadeia fortes respostas inatas e estereotipadas ao animal, ao contrário do que parece acontecer com odor de fêmea, que necessita de um contato social prévio para que a resposta se manifeste (KOZHEVNIKOVA e ZOLOTYKH, 2017).

Na literatura, tem-se observado um prejuízo da função da via olfatória principal em modelos animais de Parkinsonismo utilizando-se odor de essência de limão, entre outros (BONITO-OLIVA, MASINI e FISONE, 2014; AURICH et al., 2017). Entretanto, até que ponto esta perda de função olfatória oriunda dos modelos acomete igualmente ambas as vias olfatórias dos animais e como isto pode influenciar nos testes olfatórios ainda não está esclarecido, tampouco o nível de comprometimento olfatório decorrente de uma hiposmia nestes modelos. Em contrapartida, em humanos, o sistema olfatório principal é o responsável pelos prejuízos advindos da doença, com perda da acuidade olfativa abrangendo diferentes tipos de odores, não apenas alguns específicos (DOTY, DEEMS e STELLAR, 1988), levando em conta tanto a capacidade de detecção, de identificação, de memória e de discriminação de um odor e outro. Estima-se que 90% dos pacientes parkinsonianos apresentam déficits na identificação de odores, não se relacionado aparentemente com a severidade ou duração da doença ou uso de medicamentos (DOTY, DEEMS e STELLAR, 1988). Além disso, a disfunção olfatória na DP é considerada robusta e destaca-se da perda olfativa relacionada a outras patologias, o que leva os testes olfatórios em humanos a terem igual

importância e a representarem uma ferramenta útil para realizar o diagnóstico diferencial de DP (HAEHNER et al., 2009; DOTY, 2012).

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho, pôde-se observar que os três tipos de odores (familiar, apetitivo e aversivo) foram capazes de gerar respostas bem distintas entre si. Verificou-se um prejuízo na capacidade olfatória dos animais no grupo Zicam por meio do teste de discriminação social. Já animais lesionados com as neurotoxinas tiveram uma perda olfatória significativa revelada através do teste de aversão ao odor, teste o qual apresentou resultados mais expressivos que os demais no contexto de Parkinsonismo. Além disso, o parâmetro de *freezing* dos animais revelou também a capacidade do odor de gato de disparar respostas fenotípicas naturais e pronunciadas de medo em animais naive e sham, provando ser uma ferramenta interessante para avaliar de forma clara e segura o déficit olfatório decorrentes dos modelos animais da DP.

Apesar dos outros dois testes não terem demonstrado tal efeito de prejuízo da função nos modelos utilizados, acredita-se que muitos fatores ambientais e intrínsecos aos animais possam estar envolvidos modulando as respostas perante os odores. Assim, tais testes também podem ser úteis para auxiliar no entendimento fisiopatológico da DP, levando-se em consideração que ambas as vias olfatórias estão envolvidas na progressão da doença em modelo animal e também a importância de se avaliar o status olfatório como um possível biomarcador para a DP. Fazem-se imprescindíveis uma melhor compreensão sobre as variações comportamentais em relação aos testes e também novos estudos sobre o envolvimento das vias olfatórias na DP para o entendimento de todo o processo envolvido com a doença, e, nesse sentido, estes testes olfatórios em modelos animais podem contribuir imensamente para este fim.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, T. H.; DAVIDSON, T. M. Intranasal zinc and anosmia: The zinc-induced anosmia syndrome. **The Laryngoscope**, v. 116, n. 2, p. 217–20, 2006.
- ANSARI, K.A.; JOHNSON, A. Olfactory function in patients with Parkinson's disease. **Journal of Chronic Diseases**, v. 28, n. 9, p. 493–497, 1975.
- APFELBACH, R.; BLANCHARD, C. D.; BLANCHARD, R. J.; HAYES, R. A.; MCGREGOR, I. S. The effects of predator odors in mammalian prey species: a review of field and laboratory studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 1123–1144, 2005.
- AURICH, M. F.; RODRIGUES, L. S.; TARGA, A. D. S.; NOSEDA, A. C. D.; CUNHA, F. D. W.; LIMA, M. M. S. Olfactory impairment is related to REM sleep deprivation in rotenone model of Parkinson's disease. **Sleep Science**, v. 10, n. 1, p. 47-54, 2017.
- BARRAUD, Q.; LAMBRECQ, V.; FORNI, C.; MCGUIRE, S.; HILL, M.; BIOULAC, B.; BALZAMO, E.; BEZARD, E.; TISON, F.; GHORAYEB, I. Sleep disorders in Parkinson's disease: The contribution of the MPTP non-human primate model. **Experimental neurology**, v. 219, n. 2, p. 574–82, 2009.
- BASSANI, T. B.; GRADOWSKI, R. W.; ZAMINELLI, T.; BARBIERO, J. K.; SANTIAGO, R. M.; BOSCHEN, S. L.; DA CUNHA, C.; LIMA, M. M. S.; AANDREATINI, R.; VITAL, M. A. B. F. Neuroprotective and antidepressant-like effects of melatonin in a rotenone-induced Parkinson's disease model in rats. **Brain Research**, v. 1593, p. 95–105, 2014.
- BEN-SHAUL, Y.; KATZ, L., C.; MOONEY, R.; DULAC, C. In vivo vomeronasal stimulation reveals sensory encoding of conspecific and allospecific cues by the mouse accessory olfactory bulb. **PNAS**, v. 107, n. 11, p. 5172–5177, 2010.
- BETARBET, R.; ZIGOVA, T.; BAKAY, R. A. E.; LUSKIN, M. B. Dopaminergic and gabaergic interneurons of the olfactory bulb are derived from the neonatal subventricular zone. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 14, n. 7-8, p. 921–930, 1996.
- BONITO-OLIVA, A.; MASINI, D.; FISONE, G. A mouse model of non-motor symptoms in Parkinson's disease: focus on pharmacological interventions targeting affective dysfunctions. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, n. 290, p. 1-12, 2014.
- BOVÉ, J. e PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 211, p. 51–76, 2012.
- BRAAK, H.; DEL TREDICI, K.; RÜB, U.; DE VOS, R. A.; JANSEN STEUR, E. N.; BRAAK, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of aging**, v. 24, n. 2, p. 197–211, 2003.

BUCK, L. B. The Molecular Architecture of Review Odor and Pheromone Sensing in Mammals. **Cell**, v. 100, p. 611–618, 2000.

CAVE, J. W.; FUJIWARA, N.; WEIBMAN, A. R. e BAKER, H. Cytoarchitectural changes in the olfactory bulb of Parkinson's disease patients. **npj Parkinson's Disease**, v. 2, n. 16011, p. 1-3, 2016.

CHAN, W.; SINGH, S.; KESHAV, T.; DEWAN, R.; EBERLY, C.; MAURER, R.; NUNEZ-PARRA, A.; ARANEDA, R. C. Mouse lacking M1 and M3 muscarinic acetylcholine receptors have impaired odor discrimination and learning. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v. 9, n. 4, p. 1-12, 2017.

CHAUDHURI, K. R.; HEALY, D. G.; SCHAPIRA, A. H.; National Institute for Clinical Excellence. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: Diagnosis and management. **The Lancet. Neurology**, v. 5, n. 3, p. 235–45, 2006.

CHIOCA, L. R.; ANTUNES, V. D.; FERRO, M. M; LOSSO, E. M.; ANDREATINI, R. Anosmia does not impair the anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice. **Life Sciences**, v. 92, p. 971- 975, 2013.

CHO, H-J.; LEE, Y. H.; KIM, B. R.; KIM, H-K.; CHUNG, H. J.; PARK, S. C.; SEONG, J. K.; YOON, J-H. e KIM, C-H. Newly developed method for mouse olfactory behavior tests using an automatic video tracking system. **Auris Nasus Larynx**, 2017.

CURTIUS, H. C., WOLFENBERGER, M., STEINMANN, B., REDWEIK, U. e SIEGFRIED, J. Mass fragmentography of dopamine and 6-hydroxydopamine: application to the determination of dopamine in human brain biopsies from the caudate nucleus. **Journal of Chromatography A**, v. 99, p. 529-540, 1974.

DEWAN, A.; PACIFICO, R.; ZHAN, R.; RINBERG, D. e BOZZA, T. Non-redundant coding of aversive odours in the main olfactory pathway. **Nature**, v. 497, p. 486–489, 2013.

DHUNGEL, S.; URAKAWA, S.; KONDO, Y. e SAKUMA, Y. Olfactory preference in the male rat depends on multiple chemosensory inputs converging on the preoptic area. **Hormones and Behavior**, v. 59, p. 193–199, 2011.

DIELENBERG, R. A.; HUNT, G. E. e MCGREGOR, I. S. 'When a rat smells a cat': the distribution of fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. **Neuroscience**, v. 104, n. 4, p. 1085-1097, 2001.

DIELENBERG, R. A. e MCGREGOR, I. S. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 25, p. 597-609, 2001.

DOS SANTOS, A. C.; CASTRO, M. A.; JOSE, E. A.; DELATTRE, A. M.; DOMBROWSKI, P. A.; DA CUNHA, C.; FERRAZ, A. C; LIMA, M. M. S. REM sleep deprivation generates cognitive and neurochemical disruptions in the intranigral rotenone model of Parkinson's disease. **Journal of neuroscience research**, v. 91, n. 11, p. 1508–16, 2013.

DOTY, R. L. Odor-guided behavior in mammals. **Experientia**, v. 42, n. 3, p. 257-271, 1986.

DOTY, R. L.; DEEMS, D. A.; STELLAR, S. Olfactory dysfunction in parkinsonism: A general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. **Neurology**, v. 38, n. 8, p. 1237–44, 1988.

DOTY, R. L. Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. **Neurobiology of Disease**, v. 46, n. 3, p. 527-552, 2012.

DUTY, S. e JENNER, P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, p. 1357–1391, 2011.

DØVING, K. B. e TROTIER, D. Structure and function of the vomeronasal organ. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 2913–2925, 1998.

FENDT, M. e ENDRES, T. 2,3,5-Trimethyl-3-thiazoline (TMT), a component of fox odor – Just repugnant or really fear-inducing? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 32, p. 1259–1266, 2008.

FERRERO, D. M.; LEMON, J. K.; FLUEGGE, D.; PASHKOVSKI, S. L.; KORZAN, W. J.; DATTA, S. R.; SPEHR, M.; FENDT, M. e LIBERLES, S. D. Detection and avoidance of a carnivore odor by prey. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 27, p. 11235–11240, 2011.

FIRESTEIN, S. How the olfactory system makes sense of scents. **Nature**, v. 413, p. 211-218, 2001.

HAEHNER, A.; HUMMEL, T.; REICHMANN, H. Olfactory dysfunction as a diagnostic marker for Parkinson's disease. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 9, n. 12, p. 1773–9, 2009.

HARDING, A. J.; STIMSON, E.; HENDERSON, J. M.; HALLIDAY, G. M. Clinical correlates of selective pathology in the amygdala of patients with Parkinson's Disease. **Brain**, v. 125, p. 2431-2445, 2002.

HIRT, M.; NOBEL, S.; BARRON, E. Zinc nasal gel for the treatment of common cold symptoms: A double-blind, placebo-controlled trial. **Ear, nose, & throat journal**, v. 79, n. 10, p. 778–80, 2000.

HÖGLINGER, G. U.; ALVAREZ-FISCHER, D.; ARIAS-CARRIÓN, O.; DJUFRI, M.; WINDOLPH, A.; KEBER, U.; BORTA, A.; RIES, V.; SCHWARTING, R. K. W.; SCHELLER, D.; OERTEL, W. H. A new dopaminergic nigro-olfactory projection. **Acta Neuropathologica**, v. 130, n. 3, p. 333-348, 2015.

HOOVER, K. C. Smell with inspiration: the evolutionary significance of olfaction. **Yearbook of physical anthropology**, v. 53, p. 63–74, 2010.

HOSOKAWA, N. e CHIBA, A. Effects of sexual experience on conspecific odor preference and estrous odor-induced activation of the vomeronasal projection pathway and the nucleus accumbens in male rats. **Brain Research**, v. 1066, n. 1-2, p. 101 – 108, 2005.

JAGMAG, S. A., TRIPATHI, N., SHUKLA, S. D., MAITI, S. e KHURANA, S. Evaluation of models of Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. 503, p. 1-13, 2016.

JAKUPOVIC, J.; KANG, N.; BAUM, M. J. Effect of bilateral accessory olfactory bulb lesions on volatile urinary odor discrimination and investigation as well as mating behavior in male mice. **Physiology Behavioral**, v. 93, n. 3, p. 467–473, 2008.

KELLER, M.; BAUM, M. J.; BROCK, L.; BRENNAN, P. A.; BAKKER, J. The main and the accessory olfactory systems interact in the control of mate recognition and sexual behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 200, n. 2, p. 268-276, 2009.

KOBAYAKAWA, K.; KOBAYAKAWA, R.; MATSUMOTO, H.; OKA, Y.; IMAI, T.; IKAWA, M.; OKABE, M.; IKEDA, T.; ITOHARA, S.; KIKUSUI, T.; MORI, K. e SAKANO, H. Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. **Nature**, v. 450, 2007.

KOVÁCS, T. Mechanisms of olfactory dysfunction in aging and neurodegenerative disorders. **Ageing Research Reviews**, v. 3, p. 215–232, 2004.

LEE, J.; LINSTER, C. e DEVORE, S. Odor preferences shape discrimination learning in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 127, n. 4, 498–504, 2013.

LEO, D.; MUS, L.; ESPINOZA, S.; HOENER, M. C.; SOTNIKOVA, T. D.; GAINETDINOV, R. R. Taar1-mediated modulation of presynaptic dopaminergic neurotransmission: Role of D2 dopamine autoreceptors. **Neuropharmacology**, v. 81, p. 283-291, 2014.

LLEDO, P-M.; GHEUSI, G.; VINCENT, J-D. Information Processing in the Mammalian Olfactory System. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 1, p. 281-317, 2005.

LANG, E. e LOZANO, A. M. Parkinson's disease. First of two parts. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 1044-1053. 1998.

LIM, J. H.; DAVIS, G. E.; WANG, Z.; LI, V.; WU, Y.; RUE, T. C; STORM, D. R. Zicam-Induced damage to mouse and human nasal tissue. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, e7647, 2009.

MALNIC, B.; HIRONO, J.; SATO, T. e BUCK, L. B. Combinatorial receptor codes for odors. **Cell**, v. 96, p. 713–723, 1999.

MANDAIRON, N.; PONCELET, J.; BENSAFI, M. e DIDIER, A. Human and mice Express similar olfactory preferences. **PLoS ONE**, v. 4, n. 1, e4209, 2009.

MAY, M. D.; BOWEN, M. T.; MCGREGOR, I. S.; TIMBERLAKE, W. Rubbings deposited by cats elicit defensive behavior in rats. **Physiology & Behavior**, v. 107, p. 711–718, 2012.

MCGREGOR, I. S.; SCHRAMA, L.; AMBERMOON, P. e DIELENBERG, R. A. Not all 'predator odours' are equal: cat odour but not 2,4,5 trimethylthiazoline (TMT; fox odour) elicits specific defensive behaviours in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 129, p. 1–16, 2002.

MOMBAERTS, P. Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, p. 263-278, 2004.

MOMBAERTS, P.; WANG, F.; DULAC, C.; CHAO, S. K.; NEMES, A.; MENDELSON, M.; EDMONDSON, J. e AXEL, R. Visualizing an Olfactory Sensory Map. **Cell**, v. 87, p. 675–686, 1996.

MORI, K. Grouping of odorant receptors: odour maps in the mammalian olfactory bulb. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, part 1, p. 134-136, 2003.

NEI, M.; NIIMURA, Y. e NOZAWA, M. The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 951-963, 2008.

NIELSEN, B. L.; RAMPIN, O.; MEUNIER, N. e BOMBAIL, V. Behavioral responses to odors from other species: introducing a complementary model of allelochemicals involving vertebrates. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. 226, p. 1-11, 2015.

NGEMA, P. N.; MABANDLA, M. V. Post 6-OHDA lesion exposure to stress affects neurotrophic factor expression and aggravates motor impairment. **Metabolic Brain Disease**, p. 1-7, 2017.

O'CONNOR, S.; JACOB, T. J. C. Neuropharmacology of the Olfactory Bulb. **Current Molecular Pharmacology**, v. 1, n. 3, p. 181-190, 2008.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. **5th edition San Diego: Academic Press**, 2005.

PREDIGER, R. D.; BATISTA, L.C.; TAKAHASHI, R. N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiology of Aging**, v. 26, n. 6, p. 957-64, 2005a.

PREDIGER, R. D.; FERNANDES, D.; TAKAHASHI, R. N. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. **Behavioural Brain Research**, v. 159, n. 2, p. 197-205, 2005b.

PRESCOTT, J.; KIM, H. e KIM, K-O. Cognitive Mediation of Hedonic Changes to Odors Following Exposure. **Chemosensory Perception**, v. 1, p. 2–8, 2008.

RODRIGUES, L. S.; TARGA, A. D. S.; NOSEDA, A. C. D.; AURICH, M. F.; DA

CUNHA, C.; LIMA, M. M. S. Olfactory impairment in the rotenone model of Parkinson's disease is associated with bulbar dopaminergic D2 activity after REM sleep deprivation. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, n. 383, 2014.

ROSS, G. W.; PETROVITCH, H.; ABBOTT, R. D.; TANNER, C. M.; POPPER, J.; MASAKI, K.; LAUNER, L.; WHITE, L. R. Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease. **Annals of neurology**, v. 63, n. 2, p. 167–73, 2007.

ROUBY, C.; POULIOT, S. e BENSAFI, M. Odor hedonics and their modulators. **Food Quality and Preference**, v. 20, p. 545–549, 2009.

SASAJIMA, H.; MIYAZONO, S.; NOGUCHI, T.; KASHIWAYANAGI, M. Intranasal administration of rotenone in mice attenuated olfactory functions through the lesion of dopaminergic neurons in the olfactory bulb. **Neurotoxicology**, v. 51, p. 106-115, 2015.

SANDERS, L. H.; GREENAMYRE, T. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson's disease and the rotenone model. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 111–120, 2013.

SERIZAWA, S.; MIYAMICHI, K. e SAKANO, H. One neuron–one receptor rule in the mouse olfactory system. **TRENDS in Genetics**, v. 20, n. 12, p. 648-653, 2004.

SOFFIÉ, M.; LAMBERTY, Y. Scopolamine effects on juvenile conspecific recognition in rats: possible interaction with olfactory sensitivity. **Behavioral Process**, v.17, p.181-190, 1988.

STAPLES, L. G.; MCGREGOR, I. S. Defensive responses of Wistar and Sprague-Dawley rats to cat odour and TMT. **Behavioural Brain Research**, v. 172, p. 351–354, 2006.

STAPLES, L. G.; MCGREGOR, I. S.; APFELBACH, R.; HUNT, G. E. Cat odor, but not trimethylthiazoline (fox odor), activates accessory olfactory and defense-related brain regions in rats. **Neuroscience**, v. 151, p. 937–947, 2008.

TRINH, K.; STORM, D. R. Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium. **Nature Neuroscience**, v. 6, n. 5, p. 519–525, 2003.

UCHIDA, N.; TAKAHASHI, Y. K.; TANIFUJI, M. e MORI, K. Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 10, p. 1035- 1043, 2000.

VERNET-MAURY, E. Trimethyl-thiazoline in fox feces: A natural alarming substance for the rat. **Olfaction and Taste**, v. 7, p. 407.

YANG, M.; CRAWLEY, J. N. Simple behavioral assessment of mouse olfaction. **Current Protocols in Neuroscience**, capítulo 8, unidade 8.24, 2009.

ZOLOTYKH, M. A.; KOZHEVNIKOVA, E. N. The effect of social experience on olfactory preference in male mice. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 189, p. 85–90, 2017.

ZOU, J.; WANG, W.; PAN, Y-W.; LU, S.; XIA, Z. Methods to measure olfactory behavior in mice. **Current Protocols in Toxicology**, unidade 11.18, 2015.

ANEXO 1



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 1114

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.195472/2017-10

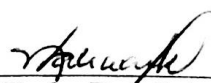
APROVADO/APPROVAL: 17/10/2017 – R.O. 09/2017

TÍTULO: Padronização de testes olfatórios em modelos animais de Parkinsonismo.

TITLE: Olfactory tests standartization in animal models of Parkinsonism.

AUTORES/AUTHORS: Marcelo de Meira Santos Lima, Priscilla Luiza Silveira de Souza, Lais Soares Rodrigues.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Fisiologia


Prof. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA